

Pharmakokinetik von 5-Fluorouracil
bei der isolierten Leberperfusion
und sein chromatographischer Nachweis
im Serum

Günther Peyerl

Disbui. München

1987

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik, Klinikum Großhadern
(Vorstand: Prof. Dr. G. Heberer)
und der Medizinischen Klinik III, Klinikum Großhadern
(Vorstand: Prof. Dr. W. Wilmanns)
der Universität München

**Pharmakokinetik von 5-Fluorouracil bei der isolierten Leberperfusion
und sein chromatographischer Nachweis im Serum**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Günther Peyerl
aus
München

1986

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: 1. Prof. Dr. med. H. Denecke
Mitberichterstatter: 1. Prof. Dr. med. G. Heberer
2. Prof. Dr. med. G. Paumgartner
Dekan: Prof. Dr. med. W. Spann
Tag der mündlichen Prüfung: 17. Dezember 1987

Meiner Frau

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINFÜHRUNG	1
1.1.	Das kolorektale Karzinom mit Lebermetastasen - Häufigkeit und Prognose	1
1.2.	Klinik der Patienten mit Lebermetastasen	6
1.3.	Therapiemöglichkeiten bei Lebermetastasen	7
1.4.	Hyperthermie	11
1.5.	5-Fluorouracil - Chemie und Biochemie	12
1.6.	Fragestellung	15
2.	PATIENTENKOLLEKTIV	16
3.	METHODIK	22
3.1.1.	Indikation der isolierten Leberperfusion	22
3.1.2.	Operationstechnik	24
3.1.3.	Ablauf der Perfusion	26
3.2.1.	Gemessene Parameter	30
3.2.2.	Probengewinnung	32
3.2.3.	Weiterverarbeitung der Blutproben und Meßmethoden	34
3.3.	Methodische Untersuchungen zur Messung des 5-Fluoro- uracils mit der Hochleistungs-Flüssigchromatographie	35
3.3.1.	Theoretische Grundlagen der Chromatographie	35
3.3.2.	Probenaufbereitung	37
3.3.3.	Ultraviolett-Spektrum von 5-Fluorouracil	40
3.3.4.	Optimierung der mobilen Phase	41
3.3.5.	Eichung	45
3.3.6.	Stabilität von 5-Fluorouracil und Streuung der Meßwerte	47
3.3.7.	Wiederfindung und untere Nachweisgrenze	49

4.	ERGEBNISSE	51
4.1.	Zusammenstellung der chromatographischen Bedingungen	51
4.2.	Leerversuch bei Normothermie und Hyperthermie	51
4.3.	Ergebnisse bei der isolierten Leberperfusion	56
4.3.1.	Temperaturverlauf, Wärmeenergiegewinn und Sauerstoffverbrauch der Leber bei der ILP mit Hyperthermie oder Normothermie	56
4.3.2.	Konzentration von 5-Fluorouracil im Perfusat	67
4.3.3.	Systemische 5-Fluorouracil-Konzentration während der Perfusion	93
4.3.4.	CEA - Konzentration im Perfusat	96
4.3.5.	CEA - Intra- und postoperativer Kurzzeitverlauf	98
4.3.6.	CEA - Langzeitverlauf	102
4.3.7.	Ammoniakkonzentration	107
4.3.8.	Überlebenszeiten	108
5.	DISKUSSION	111
5.1.	Methodik des 5-Fluorouracil-Nachweises	111
5.2.	Pharmakokinetik von 5-Fluorouracil	121
5.3.	CEA-Verlauf und Überlebenszeiten	123
6.	ZUSAMMENFASSUNG	129
7.	LITERATUR	131
	NACHWORT	

1. EINFÜHRUNG

1.1. Das kolorektale Karzinom mit Lebermetastasen - Häufigkeit und Prognose

Der Darmkrebs steht heute in vielen Ländern der westlichen Welt bei beiden Geschlechtern an zweiter Stelle unter den Krebstodesursachen. Dabei unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Morbidität, ihrer Mortalität und ihrer Trends das Dickdarmkarzinom und das Mastdarmkarzinom. Die Häufigkeit beider Krebsformen steigt an, die des Kolonkarzinoms allerdings deutlicher als die des Rektumkarzinoms. Auch die Mortalität des Kolonkarzinoms ist in der BRD wie in anderen Ländern steiler angestiegen als die des Rektumkarzinoms.

So hat in der BRD die Todesursache Kolonkarzinom bei den Männern von 2099 im Jahre 1956 auf 6195 im Jahre 1983 zugenommen, bei den Frauen von 2313 auf 9255. Die Anzahl der an Mastdarmkarzinom verstorbenen Patienten stieg von 2524 auf 3572 beim männlichen Geschlecht, beim weiblichen Geschlecht von 1823 auf 3933 (Tab. 1) [6,50]. In den Jahren 1979 bis 1983 sind von 100 an Krebs verstorbenen Patienten durchschnittlich 9 an einem Kolonkarzinom und 5 an einem Rektumkarzinom verstorben. Da die bösartigen Neubildungen mit 22% nach den Herz- und Kreislaufkrankheiten die zweitgrößte Gruppe der Todesursachen in der BRD darstellt, sterben etwa 3% der Einwohner an einem kolorektalen Karzinom [18]. Das Erkrankungsrisiko für Dickdarmkarzinome beträgt in der Normalbevölkerung 5% und entspricht der Inzidenz des Diabetes mellitus [9].

Die Prognose bei kolorektalen Karzinomen ist ganz entscheidend vom Krankheitsstadium und vom Differenzierungsgrad abhängig [23]. Die Heilungschancen aller Tumorstadien zusammen beträgt 50% und ist günstiger als bei der Mehrzahl aller anderen malignen Tumoren (Tab. 2) [9]. Wie diese Tabelle zeigt, verschlechtert sich die Prognose erheblich bei Auftreten von Fernmetastasen. Nur etwa 4%

Tumorbedingt		1956	1979	1980	1981	1982	1983	79-83
Verstorbene								
♂	Alle							100%
	Kolon	2099	5779	5942	5917	6093	6195	7,6%
	Rektum	2524	3940	3945	3815	3663	3572	4,8%
	Kolorektal	4623	9719	9887	9732	9756	9767	12,4%
♀	Alle							100%
	Kolon	2313	8481	8829	8766	8826	9255	11,1%
	Rektum	1823	3999	3977	3878	3892	3933	5,0%
	Kolorektal	4136	12480	12806	12644	12718	13188	16,1%

Tabelle 1: Veränderung der tumorbedingten Mortalität bei kolorektalen Karzinomen in der BRD [6,50].

der Patienten mit metastasierendem kolorektalen Karzinom leben 5 Jahre nach der Diagnosestellung.

Kolorektale Karzinome zeigen ein relativ langsames Tumorwachstum. Die Tumorverdopplungszeit für Metastasen beträgt nur bei 30 Prozent weniger als 60 Tage, bei 30 Prozent 60 bis 100 Tage, bei 30 Prozent mehr als 100 Tage. In der Regel limitiert jedoch das Wachstum dieser Metastasen die Lebenserwartung der Patienten [9].

Die Leber ist für viele Karzinome bevorzugter Metastasierungsort. Die bedeutendsten Primärkarzinome sind die von Pankreas, Gallenblase, Magen, Darm, Brust, Lunge, Ösophagus und Haut. Von 8455

DUKES-Stadium*	Überlebenszeiten nach	
	5 Jahren	10 Jahren
A	79,6%	76,3%
B	74,4%	65,2%
C	37,3%	28,8%
D	4,1%	3,7%

*A	Tumorwachstum auf Darmwand beschränkt, Infiltration maximal bis in die Muscularis propria, keine Lymphknoten befallen
*B	Tumorwachstum über die Muscularis propria hinaus, keine Lymphknoten befallen
*C	Lymphknotenbefall (bei Tumorausbreitung A oder B)
*D	Fernmetastasen

Tabelle 2: Prognose bei kolorektalen Karzinomen in Abhängigkeit vom Tumorausbreitungsstadium [46].

Autopsien an Krebs verstorbener Patienten hatten 39 Prozent Lebermetastasen. Bei 81 Patienten (2,5%) waren die Metastasen auf die Leber begrenzt. Die Wahrscheinlichkeit isolierter Lebermetastasen ist bei Karzinomen des Vena portae-Typs (4,2%) 7 mal so hoch wie bei Karzinomen des Vena cava-Typs (0,5%). Nur 6 Prozent der Patienten mit Lebermetastasen hatten solitäre Filiae, wären also unter Umständen für die chirurgische Resektion geeignet [11]. Bei diesen Zahlen ist einschränkend zu berücksichtigen, daß sie auf Autopsiematerial beruhen. In früheren Krankheitsstadien ist isolierter Leberbefall sicher häufiger. Die Tendenz zu generalisierter



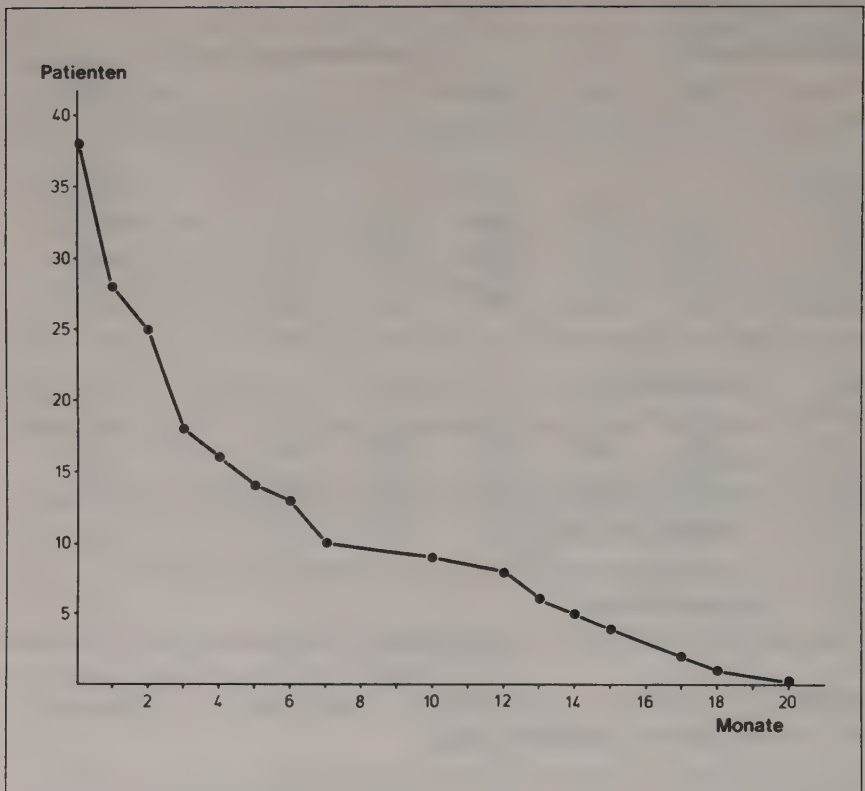


Abbildung 1: Spontanverlauf von Patienten mit Lebermetastasen kolorektaler Karzinome nach BENGMARK [7].

Metastasierung ist jedoch deutlich. Man darf deshalb die Indikation zu einer regionalen Metastasentherapie nicht zu spät stellen.

Wie oben erwähnt ist die Metastasierung in die Leber bei kolorektalen Karzinomen wesentlich häufiger. Bis zu 70% der Patienten

	Mittlere ÜLZ Monate	Mediane ÜLZ Monate
CADY et al. [11]	13	7
MODLIN und WALKER [11]	11	8
NIELSEN [38]		
wenige Metastasen	18	-
mehrere Metastasen	9	-
multiple Metastasen	5	-
WOOD [58]		
solitär	17	-
mehrere unilobulär	11	-
multiple bilobulär	3	-

Tabelle 3: Überlebenszeit (ÜLZ) bei Lebermetastasen kolorektaler Karzinome.

im fortgeschrittenen Krankheitsstadium entwickeln Lebermetastasen, bei etwa der Hälfte dieser Gruppe ist die Leber einziger Manifestationsort [27]. Bei der Operation des Primärtumors wurden von BENGMARK und HAFSTRÖM bereits bei 24% Lebermetastasen gefunden, von OXLEY und ELLIS bei 18% und von MORRIS und Mitarbeitern bei 14,5% [8, 35, 39].

Die mittlere Überlebenszeit dieser Patienten beträgt dann nur noch 6 - 9 Monate [7, 19, 40]. Abbildung 1 zeigt die Überlebenszeiten nach Laparotomie von 38 Patienten mit Lebermetastasen eines kolorektalen Karzinoms [7]. Zehn Patienten starben während des ersten postoperativen Monats, weitere zehn in den folgenden zwei

Monaten. 13 Patienten waren nach sechs Monaten noch am Leben, 8 nach zwölf und einer nach sechzehn Monaten. Die längste beobachtete Überlebenszeit betrug 20 Monate.

CADY et al. berichten eine durchschnittliche Überlebenszeit von 13 Monaten und eine mediane Überlebenszeit von 7 Monaten. Diese Patienten hatten asymptomatische Lebermetastasen, die erst intraoperativ entdeckt wurden. MODLIN und WALKER berichten ähnliche Zahlen, 11 Monate für die mittlere und 8 Monate für die mediane Überlebenszeit (Tab. 3) [11]. Arbeiten von NIELSEN beziehungsweise WOOD zeigen, daß die Überlebenszeit von der Metastasenquantität abhängt [38, 58]. NIELSEN berichtet eine mittlere Überlebenszeit von 18 Monaten bei Patienten mit "wenigen" Metastasen, von 9 Monaten bei mehreren Metastasen und von 5 Monaten bei multipler Lebermetastasierung. Bei einer solitären Lebermetastase stellt WOOD eine mittlere Überlebenszeit von 17 Monaten fest, bei mehreren unilobulären Metastasen 11 Monate und bei ausgedehnter bilobulärer Metastasierung eine solche von 3 Monaten.

1.2. Klinik der Patienten mit Lebermetastasen

Patienten mit Lebermetastasen sind häufig symptomlos, bei genauer Anamnese lassen sich aber zumindest Allgemeinsymptome feststellen. Die symptomlosen Lebermetastasen werden meist bei der Operation des Primärtumors gefunden, oder im Rahmen des Stagings von Karzinomen, die bekannt für Lebermetastasierung sind. Auch bei der routinemäßigen Nachsorge nach kurativer Resektion können Lebermetastasen durch planmäßige Bestimmung von Tumormarkern (CEA) und Leber-Computertomographie diagnostiziert werden.

Symptomatische Patienten klagen über Müdigkeit, Fieber, Völlege-

fühl, Schmerz, Anorexie, Gewichtsverlust oder haben bereits einen palpablen Tumor. Gelegentlich sind Aszites oder wachsender Bauchumfang zu beobachten. Die Schmerzen sind gewöhnlich dumpf, konstant und schlecht lokalisierbar. Ikterus läßt sich bis auf Spätstadien selten beobachten. Bei Auftreten ist mit einer Obstruktion der Gallengänge an der Leberpforte zu rechnen. Gewöhnlich sterben die Patienten an Leberversagen, da das normale Lebergewebe zunehmend durch Tumorgewebe verdrängt und zerstört wird. Das Leberversagen bei Metastasierung ist im allgemeinen nicht von Gelbsucht oder Juckreiz begleitet, Aszites, deutliche Anorexie und periphere Ödeme durch Proteinverlust können auftreten [11].

1.3. Therapiemöglichkeiten bei Lebermetastasen

Bis heute gibt es keine wirklich befriedigende Therapie von Lebermetastasen nach kolorektalem Karzinom. Die Zahlen für Ansprechraten Überlebenszeiten sind letztlich alle ernüchternd.

Prinzipiell gibt es folgende Therapiemöglichkeiten:

1. Systemische Chemotherapie

2. Regionale Chemotherapie

über Arteria hepatica und/oder Vena portae-Katheter als

- a) Langzeitinfusion
- b) Kurzzeitinfusion
- c) Bolusinjektion
- d) Isolierte Leberperfusion

3. Chirurgische Therapie

- a) Metastasenenukleation
- b) Leberteilresektion
- c) Lebertransplantation
- d) Leberdearterialisierung

4. Bestrahlung

ad 1) Seit seiner Einführung durch Charles Heidelberger im Jahre 1957 ist das 5-Fluorouracil Standardtherapeutikum bei der Behandlung fortgeschrittener kolorektaler Karzinome [54]. In früheren Studien wurde eine durchschnittliche Ansprechrate von 24% angegeben. Die Kriterien der Remission waren jedoch nicht eindeutig festgelegt. Es wurde auch nicht angegeben, ob der Tumor in die Leber metastasiert hatte, oder nicht [27]. In Untersuchungen mit klar definierten Ansprechkriterien, etwa einer Tumorreduktion um 30 oder 50 Prozent, lag die Ansprechrate nur noch bei 15 Prozent. Die Kombination von 5-Fluorouracil mit anderen Zytostatika bringt keine deutlichen Vorteile. Die intravenöse Chemotherapie kann als Bolusinjektion oder als Infusionsbehandlung durchgeführt werden. Übelkeit, Erbrechen, Durchfall, Haarausfall, Stomatitis und Blutbildveränderungen als wichtigste Nebenwirkungen treten bei mehr als 50 Prozent der therapierten Patienten auf [25].

ad 2) Im Vergleich mit der systemischen Chemotherapie ist bei der regionalen Chemotherapie die Rate der zytostatikabedingten Nebenwirkungen wesentlich geringer. Die Indikation der regionalen Chemotherapie beschränkt sich jedoch vorwiegend auf die isolierte Lebermetastasierung. Systemspezifische Komplikationen sind seit der Einführung vollständig implantierbarer Pumpen beziehungsweise Reservoirs seltener geworden.

Die Blutversorgung der Leber stammt zu 80-95% aus der Pfortader, während die Blutversorgung von größeren Lebermetastasen fast ausschließlich über die Arteria hepatica erfolgt [42]. Deshalb bringt die intraarterielle Infusion eine hohe Konzentration des Zytostatikums im Tumor, vermutlich das 5-20fache der Konzentration im umliegenden Lebergewebe. Allerdings konnten ACKERMAN et al. zeigen, daß kleine Metastasen von der Arteria hepatica und von der Pfortader versorgt werden [53]. Die Wirkung eines Zytostatikums ist nicht zuletzt von seiner Konzentration am Wirkort abhängig, ob

jedoch aus der Menge des Blutflusses auf die Höhe der Anreicherung von Zytostatikum direkt geschlossen werden darf, bleibt zu untersuchen.

Die regionale Verabreichung des Zytostatikums kann, wie erwähnt, unterschiedlich durchgeführt werden. Zu berücksichtigen sind Gefäßvariationen (ev. Zweigefäßversorgung) bei der Katheterimplantation, damit die gesamte Leber von Zytostatikum durchströmt wird. Der Vorteil der regionalen Chemotherapie ist, das Zytostatikum in hoher Konzentration an den Ort des Tumors zu bringen, ohne beim Patienten systemische Nebenwirkungen zu verursachen. Die systemische Belastung mit Chemotherapeutikum ist bei der Langzeit- und Kurzzeitinfusion, wie bei der Bolusinjektion von der Extraktionsfähigkeit der Leber abhängig. Bei der von AIGNER [1,3] beschriebenen isolierten Leberperfusion wird das Zielorgan intraoperativ vom systemischen Kreislauf getrennt, in der Vorstellung, systemisch keine oder allenfalls geringe Zytostatikaspiegel zu erreichen. Außerdem werden Arteria hepatica und Vena portae kanüliert.

Vergleichende Untersuchungen zwischen systemischer Chemotherapie und Arteria hepatica-Infusionstherapie zeigen, daß die Remissionsrate bei der Arteria hepatica-Infusion mit 55% deutlich höher ist, als bei systemischer Therapie mit 19,6% [25]. Bei der medianen Überlebenszeit lassen sich keine Unterschiede feststellen. Bei A. hepatica-Infusionstherapien mit Remissionen von mehr als 50% betrug die mediane Überlebenszeit 9,4-15 Monate für Patienten ohne vorhergehender Chemotherapie, bei Patienten mit vorhergehender Chemotherapie 5-9 Monate. Bei der systemischen Chemotherapie mit Remissionen durchwegs unter 50% erzielt man Überlebenszeiten von 6-13 Monaten.

ad 3) Die chirurgische Resektion von Lebermetastasen ist bislang die einzige Chance einer kurativen Therapie. Die enorme Regenera-

tionsfähigkeit der Leber und eine ausreichende Leberfunktion auch durch kleine Segmente erlauben die Resektion von 70-80% des Lebergewebes [36]. Bei der Operation des Primärtumors wird in etwa 20% eine Lebermetastasierung diagnostiziert. Nur etwa ein Viertel dieser Metastasen sind resezierbar, das entspricht also einer Resezierbarkeit von nur 5% aller Leberfiliae. Voraussetzung für die Resektion ist eine solitäre Metastase oder die Begrenzung auf einen Lappen oder ein Segment. Die Operationsmortalität beträgt 5% [21]. 44% der Patienten leben 2 Jahre nach der Operation, 22% länger als 5 Jahre nach der Leberresektion. Die Frage der Resezierbarkeit stellt allerdings eine gewisse Selektion prognostisch günstigerer Patienten dar. Konsequenterweise entspräche einer maximalen Resektion die orthotope Lebertransplantation. Diese aufwendige Operation hat jedoch bis heute keine Bedeutung bei der Behandlung von Lebermetastasen eines kolorektalen Karzinoms erlangt.

Die Charakteristik der Blutversorgung von Lebertumoren führte zu dem Therapieversuch einer Ligatur der Arteria hepatica. Es zeigte sich jedoch eine rasche Kompensation durch einen Anstieg der Metastasendurchblutung über die Vena portae. Eine Devaskularisation der Tumormikrozirkulation mit Mikrosphären scheint effektiver zu sein [36].

ad 4) Die externe Bestrahlungstherapie von Lebermetastasen wird durch die geringe Strahlentoleranz des normalen Lebergewebes limitiert. Die Tumorgewebe zerstörende Gesamtdosis wird deshalb kaum erreicht, ohne einen strahlungsinduzierten Leberschaden zu verursachen. Eine Kombination von externer Bestrahlung und intraarterieller Chemotherapie ergibt bessere Ergebnisse als die Bestrahlung allein, jedoch durchaus vergleichbar mit denjenigen der alleinigen intraarteriellen Chemotherapie. Mit der kombinierten Injektion von 5-Fluorouracil und 90-Yttrium markierten Mikrosphären in die Arteria hepatica gibt es wenig klinische Erfahrungen. Das

Prinzip ist ein lokal hoher Zytostatikaspiegel und gleichzeitig eine lokalisierte Bestrahlung. Eine neue Strategie ist der Einsatz von radioaktiven Immunglobulinen, die spezifisch gegen tumorassoziierte Antigene, wie das CEA, gerichtet sind [28].

1.4. Hyperthermie

Bei in-vitro Versuchen beobachtete man sehr oft, daß Tumorzellen wärmeempfindlicher als normale Zellen sind. Sie sterben bei etwas niedrigeren Temperaturen als nicht entartete Zellen. Ähnliche Beobachtungen machte man bei der Behandlung induzierter Tumoren im Tierversuch [52]. Die Zellschädigung wird wahrscheinlich durch das Zusammenwirken mehrerer Faktoren verursacht. Man postuliert eine Störung der Zellatmung, verbunden mit Veränderungen der Nukleinsäure- und Proteinsynthese. Das Fehlen lebenswichtiger Enzymsysteme, eine gesteigerte Zellmembranpermeabilität und die Freisetzung von Lysozymen können zum Zelltod führen.

Blutgefäße eines Tumors haben einen relativen Mangel an glatten Muskelzellen [51]. Ein Anstieg der Durchblutung als Reaktion auf thermische Belastung läßt sich deshalb nur begrenzt oder nicht registrieren. Folglich wird die zugeführte Wärme aus dem Tumorgewebe schlechter abgeleitet als aus Normalgewebe, oder anders ausgedrückt, Tumorgewebe wird bei gleicher Energiezufuhr stärker erwärmt. Dieser Effekt läßt sich aber nur ab einer gewissen Metastasengröße beobachten, weil umliegendes Gewebe mit normaler Gefäßreaktion Wärme ableitet. Außerdem muß die Wärmeapplikation von der Gefäßversorgung unabhängig sein. Meistens werden Hochfrequenz-Magnetspulen-Induktionssysteme verwendet.

Die Effektivität der Hyperthermie steigt mit der Temperatur und der

Behandlungsdauer. Die unterschiedliche Thermosensitivität zwischen Tumorzellen und normalen Zellen geht über 45°C verloren, und eine irreversible Eiweißdenaturierung auch in den gesunden Zellen erlaubt keine beliebig hohe Erwärmung. Deshalb versuchte man häufiger eine Kombination von Hyperthermie und Chemotherapie. Teilweise zeigte sich auch tatsächlich ein synergistischer Effekt [52].

1.5. 5-Fluorouracil – Chemie und Biochemie

Fluorouracil ist eines der wenigen zytostatischen Medikamente, dessen Erstsynthese im wesentlichen auf theoretischen Überlegungen beruhte. Charles Heidelberger konnte erstmals 1957 diese Verbindung herstellen [54].

5-Fluorouracil gehört zur Gruppe der Antimetaboliten. Seine Strukturformel entspricht der des Uracils, mit Ausnahme des Fluoratoms

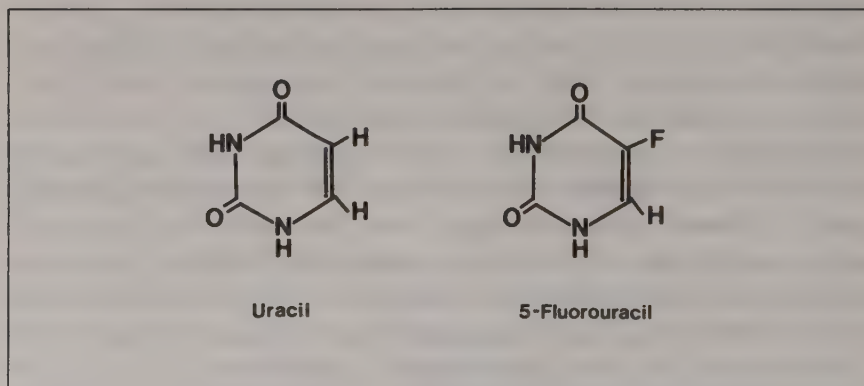


Abbildung 2: Chemische Struktur von Uracil und 5-Fluorouracil.

in Position 5 (Abb. 2). Es hat ein Molekulargewicht von 130,08. 1 µg/ml entspricht also einer Konzentration von 7,7 µmol/l, oder umgekehrt $1 \mu\text{mol/l} = 0,13 \mu\text{g/ml}$.

Im folgenden soll kurz auf den Wirkungsmechanismus des 5-Fluorouracils (5-FU) eingegangen werden. Es erlangt seine zytostatische Wirksamkeit erst nach dem Einbau in ein entsprechendes Nukleotid. Stark vereinfacht ist der Anabolismus und der Wirkmechanismus der fluorierten Pyrimidine in Abbildung 3 dargestellt. 5-FU kann in Fluoruridinmonophosphat (FUMP) umgewandelt werden, entweder über Fluoruridin (FUR) und Phosphorylierung zu Fluoruridinmonophosphat (FUMP) oder direkt durch Bindung an eine Phosphoribosylgruppe mittels der Phosphoribosyltransferase. Nach weiterer Phosphorylierung zu FUDP und FUTP kommt es zu einem Einbau von FUTP in die verschiedenen Formen der RNS. Die fluorierten UTP-Anteile führen dann zu einer veränderten Funktion der RNS, sodaß die betroffene Zelle durch eine gestörte Eiweißsynthese untergehen kann. Neben diesen Einflüssen auf die RNS kommt aber auch der Hemmung der DNS-Synthese eine entscheidende Bedeutung zu. 5-FU kann entweder über Fluordesoxyuridin (FUDR) direkt oder über den Weg des FUDP mit anschließender Reduktion und Dephosphorylierung zu Fluordesoxyuridinmonophosphat (FDUMP) umgewandelt werden. FDUMP hemmt kompetitiv die de-novo Synthese von Thymidinmonophosphat (DTMP) aus Desoxyuridinmonophosphat (DUMP) und Methylentetrahydrofolsäure ($\text{CH}_2=\text{THF}$) über die Thymidylatsynthetase (TS). Sofern der Mangel von DTMP nicht durch Phosphorylierung von endogenem oder hinzugefügtem Thymidin über die Thymidinkinase-Reaktion ausgeglichen wird, führt die aus dem DTMP-Mangel reduzierende Verarmung an Thymidintriphosphat (TTP) zu einer Störung der DNS-Synthese und zum Untergang der betroffenen Zelle [48].

Die zytotoxische Wirkung auf dem Weg einer RNS-Funktionsstörung kann in jeder Phase des Zellzyklus erfolgen, während die

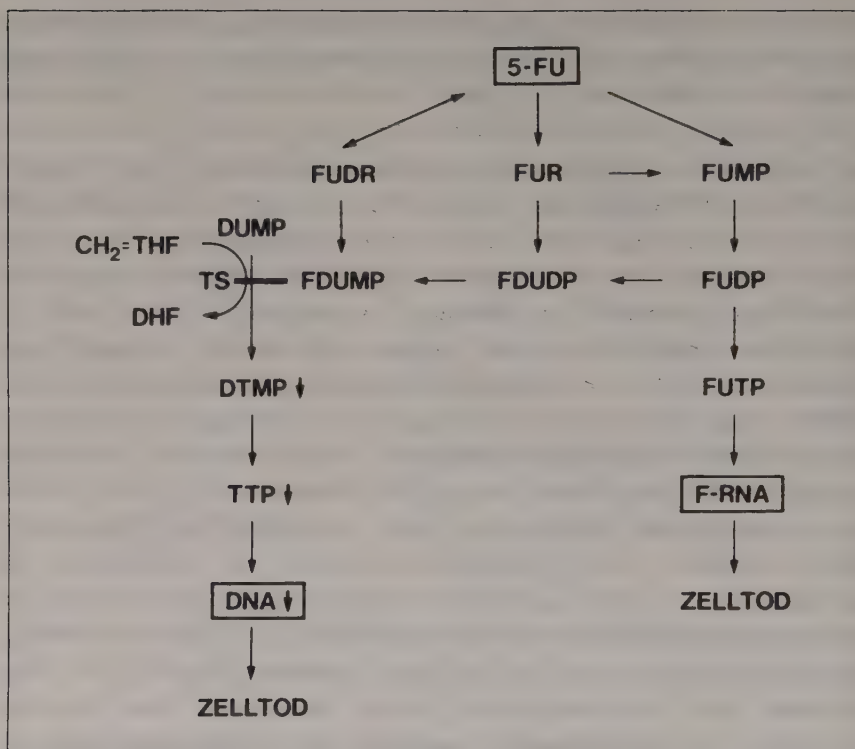


Abbildung 3: Anabolismus von 5-Fluorouracil

Abkürzungen:

5-FU	5-Fluorouracil
FUMP	Fluoruridinmonophosphat
FUDP	Fluoruridindiphosphat
FUTP	Fluoruridintriphosphat
FUR	Fluoruridin
FUDR	Fluordesoxyuridin
FDUMP	Fluordesoxyuridinmonophosphat
FDUDP	Fluordesoxyuridindiphosphat
DUMP	Desoxyuridinmonophosphat
DTMP	Desoxythymidinmonophosphat
TTP	Thymidintriphosphat
DHF	Dihydrofolsäure
CH ₂ =THF	Methylen tetrahydrofolsäure

DNS-Synthesestörung phasenspezifisch ist und sich auf die S-Phase beschränkt [54].

Mit der meist üblichen intravenösen Gabe von 5-FU in einer Dosierung von 10-15 mg/kg Körpergewicht werden nach CHABNER und MYERS [11a] Plasmaspiegel von 0,1 bis 1,0 mM erreicht, die mit einer Halbwertszeit von etwa 10 Minuten abfallen. 5-FU wird größtenteils sehr schnell in der Leber, aber auch in extrahepatischen Zellen, etwa den gastrointestinalen Mukosazellen, zu Dihydro-5-Fluorouracil und weiter zu Harnstoff, α -fluoro- β -Alanin und CO₂ metabolisiert. Etwa 15-20% des 5-Fluorouracils werden über die Nieren ausgeschieden.

1.6. Fragestellung

Die insgesamt unbefriedigenden Therapieerfolge erfordern nach wie vor große Anstrengungen, um die Prognose von Patienten mit Lebermetastasen zu verbessern. Unsere Aufgabenstellung gliedert sich in drei Schwerpunkte:

1. Die isolierte Leberperfusion (ILP) wird in der Vorstellung eingesetzt, am Ort des Tumors eine hohe Zytostatikakonzentration zu erreichen, ohne dabei systemische Nebenwirkungen zu verursachen. In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob und gegebenenfalls wie viel und wie schnell das Zytostatikum aus dem Perfusat extrahiert wird und ob Hyperthermie einen Einfluß auf die Extraktionsgeschwindigkeit hat.
2. Da an unserem Klinikum weder im Forschungsbereich noch routinemäßig ein Verfahren der 5-Fluorouracil-Messung existiert, soll eine praktikable Nachweismethode entwickelt werden. Das Verfahren soll einfach, schnell, reproduzierbar und preisgünstig sein.

3. Das karzinoembryonale Antigen (CEA) ist ein wichtiger Tumormarker bei kolorektalen Karzinomen. Insbesondere zur Therapie- und Verlaufskontrolle sind CEA-Serienbestimmungen von Nutzen. Kann man als unmittelbare Folge der ILP CEA-Spiegel-Änderungen beobachten? Sind sie als Wirkung auf den Tumor zu verstehen? Lassen sich prognostische Faktoren aus dem perioperativen CEA-Kurzzeitverlauf ableiten? Sind im CEA-Langzeitverlauf Zeichen eines Therapieerfolges zu erkennen?

2. Patientenkollektiv

Im Zeitraum von Januar 1984 bis August 1985 konnten wir bei elf

Patient	Nr.	Alter	Geschlecht	Größe (cm)	Gewicht (kg)
N.G.	1	48	M	181	85
S.O.	2	54	M	169	70
D.M.	3	41	W	172	65
S.W.	4	56	M	170	72
W.R.	5	44	M	172	76
Z.A.	6	51	W	156	52
Z.R.	7	55	W	158	57
Z.Al.	8	46	M	175	76
W.F.	9	53	M	180	92
H.A.	10	50	M	176	84
W.E.	11	56	W	156	56

Tabelle 4: Patientendaten.

Patienten die isolierte Leberperfusion durchführen. Die Patienten, vier Frauen und sieben Männer, waren 41 - 56 Jahre alt, mit einem Median von 51 Jahren (Tab. 4).

Mit allen Patienten wurde über das Prinzip der Operation und die intraoperative Zytostatikagabe ausführlich gesprochen. Außerdem wurden sie über mögliche andere Therapieformen aufgeklärt, waren jedoch trotz der erhöhten Belastung durch die Operation mit der

Patient	Primärtumor	Stadium	Operation
N.G. 1	Rektum-Ca	pT2,pNX,pM1,G3	abdominoperineale Rektumexstirpation
S.O. 2	Kolon-Ca	pT3,pN1,pM1,G2	Palliative Hemi- kolektomie rechts
D.M. 3	Sigma-Ca	pT3,pN1,pM0,G2	Sigmaresektion
S.W. 4	Rektum-Ca	pT2,pN0,pM0,G2	tiefe anteriore Resektion
W.R. 5	Sigma-Ca	pT3,pN1,pM0,G2	Sigmaresektion
Z.A. 6	Rektum-Ca	pT3,pN1,pM0,G2	abdominoperineale Rektumexstirpation
Z.R. 7	Sigma-Ca	pT2,pN0,pM1,G2	Sigmaresektion
Z.Al. 8	Sigma-Ca	pTX,pNX,pM1,G2	Rektosigmoidresektion
W.F. 9	Sigma-Ca	pT2,pN0,pM0,G2	Sigmaresektion
H.A. 10	Rektum-Ca	pT3,pN1,pM1,G3	tiefe anteriore Resektion
W.E. 11	Sigma-Ca	pT2,pN0,pM0,G2	abdominoperineale Rektumexstirpation

Tabelle 5: Primärtumor, Tumorstadium und durchgeführte Operation.

Durchführung der isolierten Leberperfusion einverstanden (informed consent). In keinem Fall mußten während oder nach der Operation zusätzliche Katheter etc. für die Probennahme gelegt werden, die nicht bereits für die anästhesiologische Überwachung vorhanden waren.

Die Karzinome, die zur Lebermetastasierung führten, waren in vier Fällen im Rektum lokalisiert, in sechs im Sigma und in einem Fall im Colon ascendens im Bereich der Flexura hepatica (Tab. 5).

Bei fünf unserer Patienten wurde bei der Operation des Primärtumors eine Lebermetastasierung erstmals diagnostiziert. Das Intervall

Patient	Operation - ILP	Lebermetastasen - ILP
N.G. 1	15	15
S.O. 2	2	2
D.M. 3	10	9
S.W. 4	14	4
W.R. 5	29	1
Z.A. 6	24	4
Z.R. 7	11	11
Z.Al. 8	7	7
W.F. 9	8	2
H.A. 10	11	11
W.E. 11	35	8

Tabelle 6: Zeitraum zwischen der Operation des Primärtumors und der isolierten Leberperfusion (ILP) und Zeitraum zwischen der Diagnose der Lebermetastasierung und der ILP in Monaten.

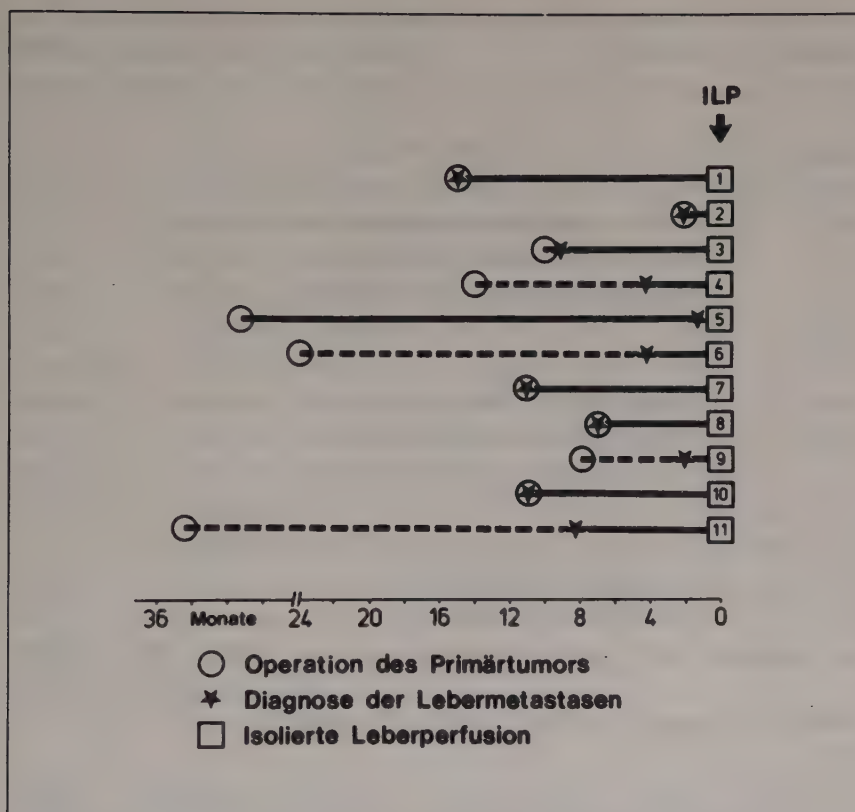


Abbildung 4: Krankheitsverlauf vor der isolierten Leberperfusion.

zwischen der Operation und der ILP betrug 2 - 35 Monate, zwischen Diagnose der Leberfiliae und ILP 1 - 15 Monate, mit einem Median von 11 beziehungsweise 8 Monaten (Tab. 6, Abb. 4).

Die Tabelle 7 zeigt, welche therapeutischen Maßnahmen bis zur isolierten Leberperfusion durchgeführt wurden. Bei der Patientin

Patient	Therapie	Monate vor ILP
N.G. 1	Ø	
S.O. 2	Ø	
D.M. 3	linkslaterale Leberlappenresektion, atypische Resektion von zwei Metastasen im rechten Leberlappen	8
S.W. 4	Ø	
W.R. 5	Ø	
Z.A. 6	Chemotherapie (Ansfield)	4 - 0
Z.R. 7	5-Fluorouracil und Methotrexat	4 - 3
	5-Fluorouracil und Leukovorin	2 - 0
Z.Al. 8	Ø	
W.F. 9	Ø	
H.A. 10	Chemotherapie (Ansfield)	9 - 6
W.E. 11	Chemotherapie (Ansfield)	7 - 0

Tabelle 7: Therapie vor der isolierten Leberperfusion.

D.M. (3) konnte eine große Metastase im linken Leberlappen durch eine linkslaterale Leberlappenresektion entfernt werden, zusätzlich zwei kleinere im rechten Leberlappen durch eine atypische Resektion. Die drei Patienten Z.A. (6), H.A. (10) und W.E. (11) wurden die letzten Monate vor der ILP nach dem Ansfield-Schema chemotherapiert. Die Patientin Z.A. (7) erhielt zunächst 5-Fluorouracil und Methotrexat, da sich keine Remission einstellte, wechselte man auf die Kombination 5-FU und Leukovorin. Sieben der elf Patienten erhielten keine vorausgehende Chemotherapie.

Patient	Metastasierungsgrad
N.G. 1	multiple, kirschgroße Metastasen in beiden Leberlappen
S.O. 2	multiple Metastasen in beiden Leberlappen bis 4 cm Ø
D.M. 3	Metastase im rechten Leberlappen mit 2,5 cm Ø
S.W. 4	multiple Metastasen im rechten Leberlappen
W.R. 5	multiple Metastasen in beiden Leberlappen
Z.A. 6	Metastase im rechten Leberlappen mit 3 cm Ø
Z.R. 7	multiple Metastasen in beiden Leberlappen
Z.Al. 8	multiple Metastasen in beiden Leberlappen
W.F. 9	multiple Metastasen in beiden Leberlappen bis 4 cm Ø
H.A. 10	zwei Metastasen im rechten Leberlappen
W.E. 11	multiple Metastasen im rechten Leberlappen, eine Metastase mit 6 cm Ø infiltriert den linken Lappen

Tabelle 8: Ausmaß der Lebermetastasierung zum Zeitpunkt der isolierten Leberperfusion.

Schwer beurteilbar ist das Ausmaß der Lebermetastasierung, bestenfalls ausgedrückt durch das Gesamtmetastasenvolumen. Bildgebende Verfahren, wie die Szintigraphie, die Computer-Tomographie und die Ultrasonographie erlauben keine exakte Abgrenzung des Metastasengewebes. Bei der intraoperativen Inspektion und Palpation gewinnt man meist auch nur einen "oberflächlichen" Eindruck. Da sich der Metastasierungsgrad auf die Prognose auswirkt, wäre eine möglichst genaue Quantitätsbestimmung wünschenswert, natürlich auch im Hinblick auf die Beurteilung einer Remission. Die Tabelle 8 erlaubt nur eine grobe Orientierung über den Grad der Metastasierung zum Zeitpunkt der isolierten Leberperfusion.

3. Methodik

3.1.1. Indikation der isolierten Leberperfusion

Der Entschluß, die isolierte Leberperfusion durchzuführen, ist vom Ergebnis mehrerer Untersuchungen abhängig. Zusammengefaßt betreffen sie die allgemeine Operabilität des Patienten und den Nachweis einer auf die Leber begrenzten Metastasierung. Abbildung 5 zeigt unsere präoperative Checkliste mit den wichtigsten abzuklärenden Punkten. Die Rektoskopie wird zum Ausschluß eines Lokalrezidivs beziehungsweise eines Zweittumors durchgeführt. Die Röntgenaufnahme der Lunge darf keine Hinweise auf eine Metastasierung geben, ebensowenig die Skelettszintigraphie einen Knochenbefall zeigen. Die Angiographie der Leberarterien läßt präoperativ Variationen der Gefäßversorgung erkennen, die möglicherweise die Operationstaktik beeinflussen. Außerdem gewinnt man Anhaltspunkte für das Vaskularisationsmuster und die Lokalisation des Tumors. Neben der Sonographie hat die Computer-Tomographie der Leber einen großen Stellenwert. Dennoch läßt sich leider nicht immer das genaue Ausmaß der Metastasierung erkennen, das weitere Vorgehen muß dann nach sorgfältiger intraoperativer Palpation der Leber unter Umständen geändert werden. So waren bei zwei Patienten mit der Computer-Tomographie bilobulär Metastasen nachgewiesen, die intraoperativ nicht verifiziert werden konnten. Deshalb wurde eine Hemihepatektomie beziehungsweise eine linkslaterale Resektion durchgeführt. Die ILP ist auch dann nicht indiziert, wenn sich während der Operation doch extrahepatische Metastasen finden.

Folgende Laborparameter wurden präoperativ bestimmt: Kalium, Natrium, Calcium, Chlorid, Kreatinin, Ammoniak, Gesamt-Eiweiß, GOT, GPT, γ -GT, Pseudocholinesterase, alkalische Phosphatase, α -Amylase, Lipase, LDH, Bilirubin gesamt und direkt, kleines Blutbild, Thrombozyten, Quick, PTT, BKS, Differentialblutbild, Blutgruppe, Plasmaelektrophorese, Urinsediment, CEA.

Präoperative Checkliste

Datum.....

Etikett

HA.....Tol.....

Patient Tel.....

Anamnese:	Primärtumor.....
	TNM
	OperationDatum
	Bisherige adj. Chemotherapie

Befunde:	AZ(Karnofsky)	Größe	Gewicht
Rektoskopie			
Koloskopie			
Rö.-Thorax			
Sono-Leber			
CT-Becken			
CT-Leber			
Szinti Skelett			
Angio Leber			

Labor: Großes Labor, Diff.BB, direktes Bilf, Ammoniak, Elpho
CEA (Labor Prof. Lamerz)

Cytostatika:	Bitte bereitstellen:	Mitomycin 10	20mg
		Fluroblastin	1000mg

Rückfragen:	Prof. Danecke	3570
	PD Dr. Schalhorn	01-208
	Dr. Dommel	01-483
	Dr. Walter	01-434
	Hr. Peyerl	3136

- 23 -

3.1.2. . Operationstechnik

Mit dem von AIGNER [1] beschriebenen Operationsverfahren werden über eine mediane Laparotomie zunächst das Ligamentum hepato-duodenale, der Ductus choledochus, die Arteria hepatica communis, die Arteria gastroduodenalis und die Vena portae dargestellt. Anschließend wird die untere Hohlvene aufgesucht und die rechte und linke Nierenvene mit Bändchen angeschlungen. Abgehende Lumbalvenen werden ligiert. Nach Mobilisierung der Leber vom Zwerchfell wird dieses ventral der Vena cava inferior quer inzidiert und die Hohlvene nach Eröffnung des Herzbeutels intraperikardial angeschlungen. Nach Ausklemmen der Vena cava wird über eine Längsvenotomie unterhalb der Nierenvenen der doppellumige Vena cava-Katheter (Abb. 6) eingelegt und mit Tourniquets fixiert.

Durch den großlumigen Anteil des Katheters strömt das Blut aus den unteren Extremitäten und den Nieren zum rechten Herzen zurück. Der dünnlumige Anteil leitet das venöse Leberblut zur Herz-Lungen-Maschine (Abb. 7). Die Vena portae wird nach distal und nach proximal kanüliert. Das sich im Mesenterialbereich sammelnde Blut gelangt über den retrograd liegenden Schlauch in das Lumen des Cavakatheters und somit wieder in den Körperkreislauf. Dieser portokavale Shunt verhindert einen Blutstau im Darm. Die von AIGNER [1] beschriebene Filtration durch eine Amicon-Hämofiltrationspatrone führten wir nicht durch. Die während der Leberperfusion fehlende Elimination toxischer Substanzen aus dem Mesenterialblut wurde von den Patienten durchwegs toleriert. Der leberwärts gerichtete Pfortaderkatheter ist einer der beiden arteriellen Schenkel und wird mit der Herz-Lungen-Maschine verbunden. Nun wird der oberste Vena cava-Tourniquet abgeklemmt und die Leberperfusion via Pfortader eröffnet. Erst dann wird die Arteria hepatica abgeklemmt und kanüliert und somit der zweite arterielle Schenkel mit der Herz-Lungen-Maschine konnektiert. Hier läßt sich

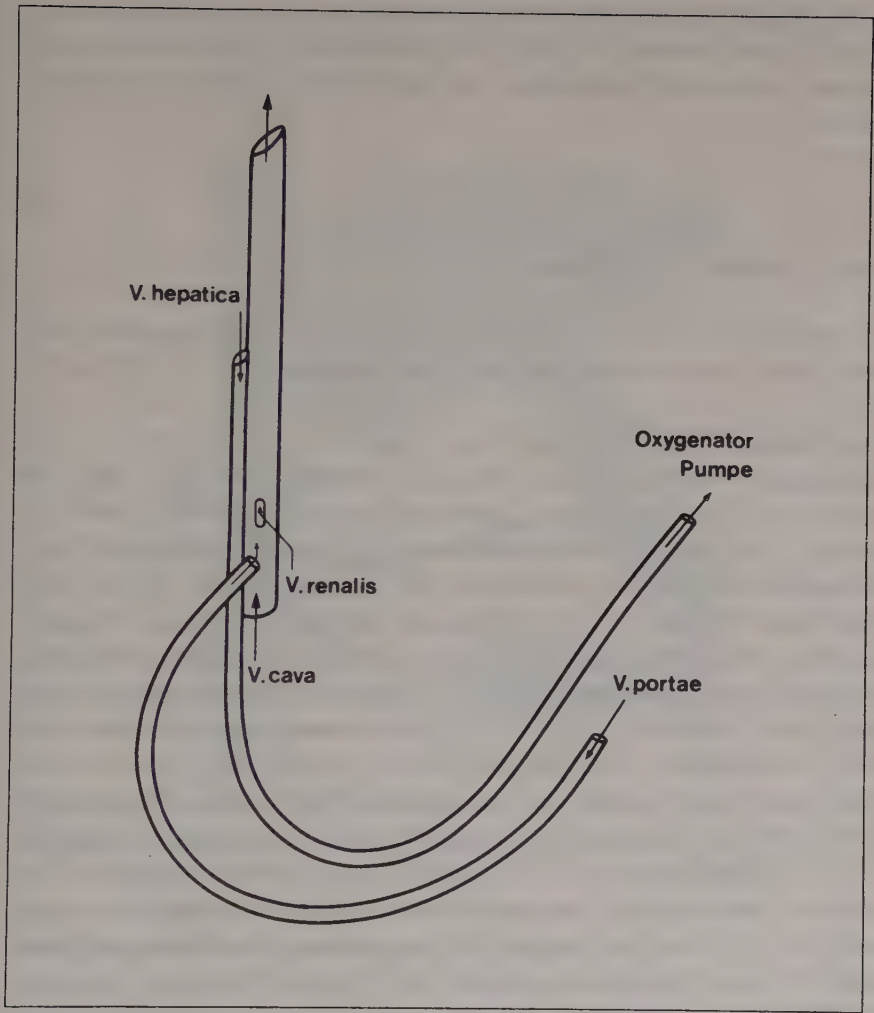


Abbildung 6: Vena cava-Perfusionskatheter nach AIGNER.

auch die Arteria gastroduodenalis kanülieren, in jedem Fall muß sie distal ligiert werden. Bei der Verbindung des arteriellen Schlauchsystems muß selbstverständlich auf vollständige Entlüftung geachtet werden.

3.1.3. Ablauf der Perfusion

Die Abbildung 8 zeigt schematisch den Aufbau des extrakorporalen Kreislaufes, die Kontrollinstrumente und Meßpunkte.

Vorbereitung: Zunächst wird das Reservoir (1) (Bentley Q 220 Cardiotomy Reservoir) mit 250 ml Humanalbumin 5%, 250 ml Glukose 5%, und 250 ml Erythrozytenkonzentrat gefüllt. 5000 IE Heparin und 25 ml Natriumbikarbonat 8,4% werden zugegeben. Die Schlauchleitung zwischen Reservoir (1) und Oxygenator (2) ist noch abgeklemmt (Punkt A). Wir verwenden einen wegwerfbaren Blutoxygenator für Säuglinge mit einem integralen Wärmeaustauscher (Bentley Spiraflor BOS-2S). Kalt- und Warmwasserzufluß erfolgen über druckfeste Schläuche (B) und (C). Die Wassertemperatur kann mit einer Mischbatterie (3) geregelt werden. Durch den Schlauch (D) fließt das Wasser wieder ab. Das Sauerstoff/Kohlendioxid-Gasgemisch wird über den Schlauch (E) zugeführt. Ein biologischer Gasfilter (F) ist zwischengeschaltet. Der Gasflow wird mit einem Rotameter (4) gemessen und reguliert. An den Punkten (G) und (H) messen wir die arterielle (G) und die venöse (H) Temperatur. Das Temperaturmeßgerät (5) zeigt diese Werte digital an. Vor der Perfusion wird die Maschinenfüllung erwärmt und oxygeniert. Dazu wird Klemme (A) geöffnet, das Blut fließt in den Oxygenator (2), über den Schlauch (I) zur rechten Rollerpumpe (6), die es über den Schlauch (K) und Shunt (M) wieder dem Oxygenator zuführt. Auf diese Weise ist der Kreislauf geschlossen. In die arteriellen Schenkel sind Blutfilter (N)

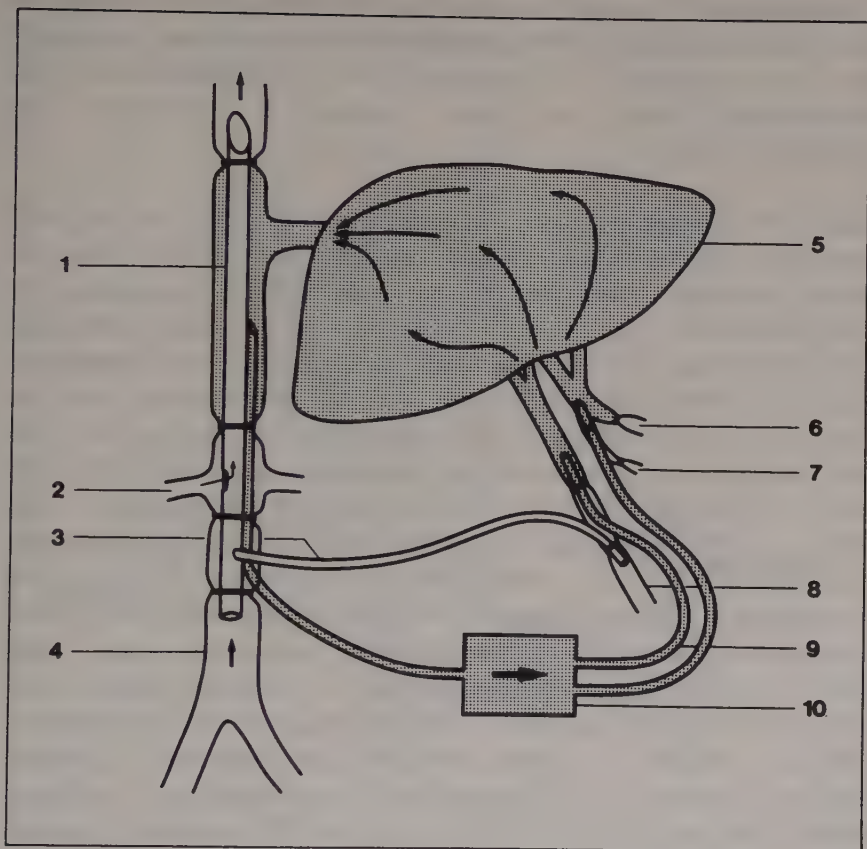


Abbildung 7: Prinzip des isolierten Kreislaufs.

- | | | | |
|---|-------------------------|----|----------------------|
| 1 | Leberperfusionskatheter | 6 | A. hepatica |
| 2 | V. renalis | 7 | A. gastroduodenalis |
| 3 | Portokavaler Shunt | 8 | V. portae |
| 4 | V. cava | 9 | Arterielle Linie |
| 5 | Leber | 10 | Pumpe und Oxygenator |

zwischen geschaltet. An diesen sind Perfusorleitungen (O) angeschlossen, die zur Ableitung eines gegebenenfalls entstehenden Überdrucks mit dem Reservoir (1) verbunden sind. Zusätzlich kann der intraluminale Druck von jedem Schenkel an Manometern (P) abgelesen werden.

Beginn der Perfusion: Nach Konnektion von Schlauch (Q) mit dem dünnlumigen Anteil des Cava-Katheters (der oberste Tourniquet ist bereits geklemmt) fließt das venöse Leberblut zum Oxygenator. Die linke Rollerpumpe (7) läuft mit geringem Fluß an. Ist der Schlauch (L) vollständig mit Blut gefüllt, wird er mit dem leberwärts gerichteten Pfortaderkatheter verbunden. Der Pfortaderfluß wird auf 150 - 250 ml/min gesteigert. Nun Verbindung von Schlauch (K) mit dem Arteria hepatica-Katheter und Abklemmen des Shunts (M). Der Flow in diesem Schenkel wird auf 200 - 400 ml/min eingestellt. Ein Druck von 80 - 100 mmHg für die Pfortader und von 150 mmHg für die Arteria hepatica sollte nicht überschritten werden. Mit nadelförmigen Sonden messen wir die Temperatur in beiden Leberlappen und in einer oder mehreren Metastasen. Diese Werte können ebenfalls am Temperaturmeßgerät (5) abgelesen werden. Der Sauerstoff-Flow wird auf 1000 - 1200 ml/min und der Kohlendioxid-Flow auf maximal 50 ml/min begrenzt. Wir bestimmen in regelmäßigen Abständen die Blutgase und den Blut-pH und variieren entsprechend die Kohlendioxidzufuhr und die Natriumbikarbonatgabe. Durch Regulation der Mischbatterie (3) wird die Erwärmung des Blutes gesteuert. Die arteriellen Temperaturen an Punkt (G) sollen 41,5°C bis 42°C nicht übersteigen. Sobald eine befriedigende Flußrate bei akzeptablem Druck erreicht ist, injizieren wir das Zytostatikum als Bolus über einen 3-Wege-Hahn bei Punkt (H) in den Oxygenator.

Unsere Patienten erhielten alle 750 mg 5-Fluorouracil (Fluroblastin^R) und 15 mg Mitomycin C (Mitomycin 10 medac).

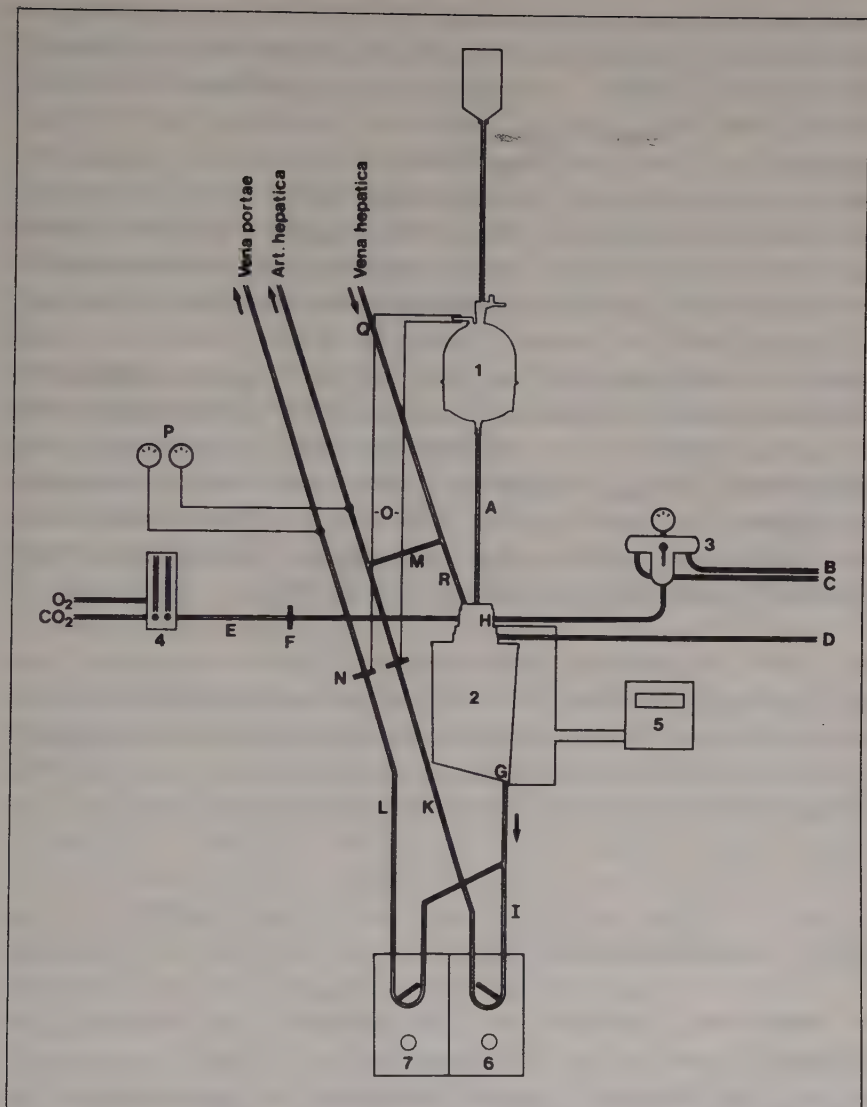


Abbildung 8: Schema des extrakorporalen Kreislaufs.

Ende der Perfusion: Noch während der Perfusion wird das Reservoir erneut mit 750 ml Glukose 5% und 500 ml Hydroxyethylstärke 6% (Plasmasteril^R) gefüllt. Klemme (A) ist geschlossen. Mit dieser Lösung wird am Ende des isolierten Kreislaufs das Perfusat ausgewaschen. Dazu wird Shunt (M) durchtrennt und das von der Leber kommende Blut in einen Eimer geleitet. Schlauch (Q) ist jetzt bei Punkt (R) abgeklemmt. Bevor der Oxygenator leerläuft, fließen aus dem Reservoir für die erneute Volumenfüllung der Leber 250 ml Humanalbumin 5% und 250 ml Erythrozytenkonzentrat nach. Nach dem Auswaschen wird der oberste Tourniquet gelöst, sodaß das venöse Leberblut wieder über die Vena cava abfließt. Die Vena portae wird ausgeklemmt, die Rollerpumpe (7) gestoppt, beide Katheter extrahiert und die Venotomie mit fortlaufender Naht verschlossen. Der Portazustrom wird freigegeben, ebenso der Hepaticadurchstrom (Rollerpumpe (6) gestoppt). Die Vena cava wird distal abgeklemmt, die Tourniquets gelöst, dann der große Cava-Katheter rasch extrahiert und die Cavotomie fortlaufend genäht.

Um später die regionale Chemotherapie fortführen zu können, wird ein Implantofix-Katheter über die Arteria gastroduodenalis soweit vorgeschoben, daß seine Spitze gerade nicht in die Arteria hepatica hineinragt. Über diesen Katheter wird 5 - 6 Wochen nach der ILP die perkutane Infusion von Zytostatikum begonnen.

3.2.1. Kontrollparameter

1. Temperatur: Während der Aufwärmphase und während der Perfusion haben wir in Abständen von 10 Minuten an mehreren Punkten die Temperatur gemessen. Bei Punkt (G) in Abbildung 8 die Temperatur des arteriellen Schenkels, bei Punkt (H) die des zurückfließenden Blutes. Um die Erwärmung des Lebergewebes zu

kontrollieren, tasteten wir die Temperatur des rechten und linken Leberlappens mit Thermosonden ab. Wenn möglich plazierten wir auch in Metastasen Temperaturfühler.

2. Gasfluß: Sauerstoff- und Kohlendioxidzufuhr waren am Rotameter abzulesen und zu regulieren. In der Regel konnten wir den Sauerstoffflow im Bereich von 1000 - 1200 ml/min halten. Der Kohlendioxidflow war zunächst auf 50 ml/min eingestellt, konnte aber nach Blutgasanalysen häufig reduziert werden.

3. Blutgasanalyse: Nicht nur um den Kohlenstoffflow dem Bedarf anzupassen führten wir Blutgasanalysen durch. Wir konnten so auch neben dem Verlauf von $p\text{CO}_2$ und $p\text{O}_2$, den Blut-pH-Wert, HCO_3^- , Base-Excess, Sauerstoffsättigung und Sauerstoffkonzentration bestimmen. Dies war vor allem in Hinblick auf die Frage des Sauerstoffverbrauchs interessant, da wir die Proben für die Blutgasanalyse gleichzeitig jeweils aus dem arteriellen und dem venösen Schenkel abnahmen.

4. Fluß und Druck: Die von uns verwendeten Rollerpumpen (Stöckert Doppelpumpe 10-20-00) werden bei Inbetriebnahme geeicht. In diese Eichung geht der Schlauchdurchmesser und die Okklusionsstellung ein. Während des Betriebes zeigt eine Digitalanzeige wahlweise die Umdrehungen oder die Fördermenge pro Minute. Beide Pumpen erzeugen einen kontinuierlichen Flow. Sie laufen ohne Drucksteuerung. Wir haben deshalb zur Überwachung des Drucks in beiden arteriellen Schenkeln Manometer angeschlossen. Diese Daten werden ebenfalls in kurzen Abständen abgelesen und protokolliert.

5. Sonstige physikalische Parameter: Der Oxygenator dient während der Perfusion auch als Volumenreservoir. Aus Sicherheitsgründen soll er immer mehr als 500 ml Blut enthalten. An einer Skala läßt sich der aktuelle Spiegel ablesen.

3.2.2. Probengewinnung

1. 5-FU-Konzentration im Perfusat. Da aus der Literatur eine sehr kurze Halbwertszeit von 5-FU bekannt ist, sollte die Fluorouracil-Konzentration im Perfusat alle 10 Minuten bestimmt werden. Für den Nullwert wird vor der Zytostatikagabe Blut entnommen. Die Proben, jeweils 8 ml, wurden am Ende des venösen Schenkels bei Punkt (H) über einen 3-Wege-Hahn abgenommen. Für die Konzentrationsmessungen benötigen wir Serum, eine Gerinnungshemmung ist also nicht nötig (Abb. 9).

2. 5-FU-Konzentration im systemischen Kreislauf. Da ein Übertritt von 5-FU aus dem isolierten Kreislauf in den Körper nicht absolut auszuschließen ist, haben wir aus einem in der Arteria radialis liegenden Katheter zu bestimmten Zeiten Blutproben abgenommen: Vor der Zytostatikagabe für den Leerwert und dann 10, 30, 60 und gegebenenfalls 90 Minuten später für die systemischen 5-FU-Spiegel. Weitere Abnahmen erfolgten eine Stunde und vier Stunden nach dem Ende der Perfusion. An den folgenden fünf postoperativen Tagen wurden die Proben aus einem zentralen Venenkatheter immer nachmittags entnommen, das heißt also 24, 48, 72, 96, 120 Stunden nach der isolierten Leberperfusion. Der letzte Wert wurde am 14. postoperativen Tag, beziehungsweise am Entlassungstag peripher-venös abgenommen (Abb. 9).

3. CEA im Perfusat. Für diese Messungen haben wir 2 Minuten vor, 2, 30, 60 und gegebenenfalls 90 Minuten nach Zytostatikagabe Proben gesammelt. Abnahmebedingungen wie unter Punkt 1 beschrieben.

4. CEA im systemischen Kreislauf. Neben dem Ausgangswert haben wir die CEA-Konzentration 60 und 90 Minuten nach Perfusionsbeginn, das heißt nach Zytostatikagabe, bestimmt. Bei kürzerer Perfusions-

Isolierte Leberperfusion

Nr.

Datum: _____
 Perfusionsabnahme: _____
 Syst. Abnahme: _____

Etikett

◆ Ammoniak

● CEA, 5-FU

Probenabnahmezeiten

Beschriftung	Systemisch	Uhr-zeit	Min	Uhr-zeit	Perfusat	Beschriftung
CEA-5S, FU-5S	◆ ● ●	Perfusionsbeginn			Gase ● ●	Zeit, art., ven. F-2P, C-2P
			-5			
			-2			
		Zytostatika gebe				
FU10S	◆ ●		2		Gase ● ●	F+2P, C+2P F10P
			10			
			15			
			20			
FU30S	◆ ●		30		Gase ● ●	F20P F30P, C30P F40P
			40			
			45			
			50			
CEA60S, FU60S	◆ ● ●		60		Gase ● ●	F50P F60P, C60P F70P
			70			
			75			
			80			
CEA90S, FU90S	◆ ● ●		90		Gase ● ●	F80P F90P, C90P FSpÜ, CeeSpÜ
		bzw. kurz vor E.				
		Ende				
CEA50nE, FU60nE	◆ ● ●		60nE			
CEA240nE, FU240nE	◆ ● ●		240nE			

CEA und 5-FU am	1.pap	2.pap	3.pap	4.pap	5.pap	14.pap
Datum, Zeit						

Abbildung 9: Probenabnahmeprotokoll. Punkte (5-FU, CEA) und Rauten (Ammoniak) entsprechen den Abnahmezeiten. Zum Zeitpunkt 0 werden die Zytostatika in den Perfusionskreislauf gegeben.

zeit wurde der Endwert entsprechend eher abgenommen. Die weiteren Abnahmezeiten entsprechen denen der systemischen 5-FU-Bestimmung, also 1. bis 5. postoperativer Tag und 14. postoperativer Tag beziehungsweise Entlassungstag (Abb. 9). Im Rahmen der Nachsorge und weiteren Therapiemaßnahmen wurden bei den Patienten die CEA-Konzentration im Serum wiederholt bestimmt.

5. Ammoniak im Körperkreislauf und in der Vena mesenterica. Wie oben erwähnt benutzen wir keine Hämofiltration, um toxische Substanzen aus dem Mesenterialblut zu eliminieren. In dieser Hinsicht ist die Höhe der Ammoniakkonzentration von Bedeutung. Wir haben intraoperativ aus der Vena mesenterica und der Arteria radialis abgenommen und postoperativ täglich kontrolliert.

3.2.3. Weiterverarbeitung der Blutproben und Meßmethoden

1. 5-Fluorouracil. Die Proben wurden erst 10 Minuten bei 3000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert, das überstehende Serum (3-4 ml) in Milliliterportionen bei minus 80°C eingefroren. Die 5-FU-Messung erfolgte nach entsprechender Serumaufbereitung mit der Hochleistungsflüssig-Chromatographie (High Performance Liquid Chromatography = HPLC). Die Nachweismethodik wurde im Rahmen dieser Arbeit aufgebaut. Die Untersuchungen zur Auswahl einer geeigneten Serumaufbereitung, mobiler Phase und anderer chromatographischer Kenngrößen werden im Kapitel 3.3. im einzelnen dargelegt.

2. CEA. Die CEA-Konzentration im Serum wurde im Labor von Prof. Lamerz (Med. Klinik II, Klinikum Großhadern) mit einem Doppel-Antikörper-¹²⁵J-Radioimmunoassay bestimmt.

3. Ammoniak. Die Bestimmung der Ammoniakkonzentration erfolgte

routinemäßig mit einer enzymatischen Meßmethode im hiesigen Institut für Klinische Chemie.

3.3. Methodische Untersuchungen zur Messung des 5-FU mit der Hochleistungsflüssig-Chromatographie (HPLC)

3.3.1. Theoretische Grundlagen der Chromatographie

Die Chromatographie ist ein Trennprozeß, bei dem das Probengemisch zwischen zwei Phasen verteilt wird. Man unterscheidet die stationäre Phase von der mobilen Phase. Wird eine Substanz stärker und öfter an die stationäre Phase gebunden, wird sie langsamer durch die mobile Phase eluiert. Es gibt verschiedene Phasenkombinationen. So kann die stationäre Phase polar und das Lösungsmittel apolar sein, wie bei der Absorptionschromatographie, als klassische Säulenchromatographie oder Dünnschichtchromatographie bekannt. Bei der Chromatographie mit Phasenumkehr, der sogenannten Reversed-Phase-Chromatographie, ist die mobile Phase polar und das Trägermaterial apolar. Meistens verwendet man Silicagele, deren endständige OH-Gruppen chemisch verändert werden. Da die Bindung sehr stabil ist, findet die Modifikation mit Octadecylsilan $(-\text{CH}_2)_{17}-\text{CH}_3$ häufig Anwendung [34]. In der Reversed-Phase-Chromatographie werden Probesubstanzen umso stärker an das Trägermaterial gebunden, je unpolarer sie sind. Da Wasser die apolaren Alkylgruppen nicht benetzen kann und damit die festgehaltene Substanz nicht verdrängen, ist es die schwächste aller mobilen Phasen und eluiert die Proben am langsamsten. Auf die anderen flüssigchromatographischen Trennverfahren soll hier nicht eingegangen werden (s.a. Kap. 5.1.)

Abbildung 10 zeigt das Schema einer HPLC-Apparatur. Das Lösungsmittel wird aus einem Vorratsgefäß (1) durch eine Fritte aus Sintermetall (2) gefiltert und von der Hochdruckpumpe (3) ange-

saugt. Durch dünne Kapillaren wird es mit hohem Druck auf die Trennsäule (4) gepreßt. Um die Trennsäule vor groben Verunreinigungen zu schützen, ist eine Vorsäule (5) zwischengeschaltet. Die zu trennenden Substanzen werden mit einer Mikroliterspritze (6) über das Probenaufgabeeventil (7) dem Eluentenstrom zugeführt. Die einzelnen Substanzen eines Probengemisches gelangen nach der Trennung zu unterschiedlichen Zeiten in die Meßzelle des UV-Detektors (8), dann in ein Auffanggefäß (9).

Der Lichtstrahl einer Deuteriumlampe wird beim Durchtritt einer Substanz durch die Detektorzelle abgeschwächt. Die Absorption hängt ab von dem substanzspezifischen Extinktionskoeffizienten ϵ , von der Konzentration c der Substanz und der durchstrahlten Schichtdicke d .

$$E = \epsilon \cdot c \cdot d$$

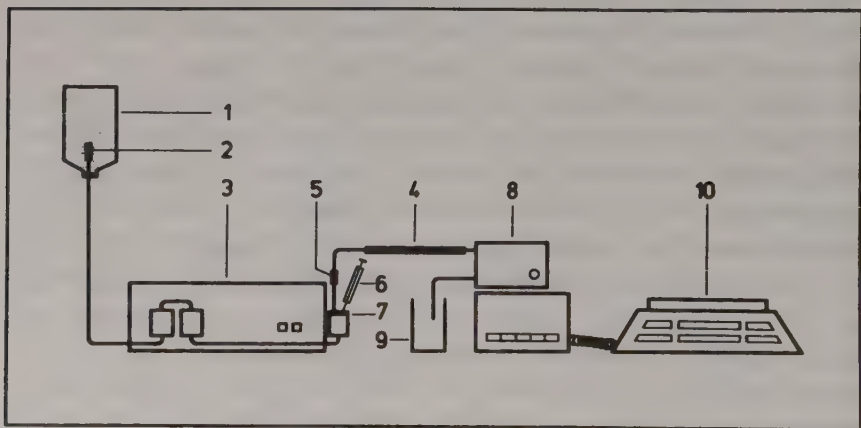


Abbildung 10: Aufbau einer HPLC-Apparatur. Beschreibung im Text.

Die verbleibende Lichtintensität wird von einer Photodiode registriert und als elektrisches Signal zum Schreiber/Integrator (10) gegeben. Die Signale nennt man Peaks, ihre Gesamtheit Chromatogramm.

Die Retentionszeit einer Komponente ist bei gleichen chromatographischen Bedingungen immer gleich groß. Sie ist die Zeit vom Einspritzen der Substanz bis zum Erscheinen des Signalmaximums. Zu den chromatographischen Bedingungen gehören Trennsäule, mobile Phase und Fließgeschwindigkeit. Injiziert man zunächst Reinsubstanz, lassen sich anhand der Retentionszeiten Peaks identifizieren. Die Peakhöhe und die Peakfläche sind der aufgetragenen Substanzmenge proportional. Mittels einer Eichkurve ist dann die Konzentration der gesuchten Substanz leicht zu bestimmen.

3.3.2. Probenaufbereitung

Wie oben erwähnt zentrifugieren wir die Blutproben zunächst 10 Minuten bei 3000 Umdrehungen pro Minute. Das überstehende Serum muß enteiweißt werden, um eine Präzipitation von Proteinen zu verhindern. Dies geschieht bei Kontakt mit organischen Lösungsmitteln oder Puffern und würde durch Verstopfung zu einem rapiden Druckanstieg im HPLC-System und zu einer Abnahme der Trennleistung der Säule führen.

Wir testeten verschiedene Techniken der Deproteinisierung (Tab. 9). Nach Zugabe von unterschiedlichen Mengen von Trichloressigsäure, Perchlorsäure oder Essigsäure kochten wir einen Teil der Proben fünf Minuten im Wasserbad. Nach erneuter Zentrifugation bei 10000 Umdrehungen pro Minute ($5500 \times g$) über 4 Minuten bestimmten wir die Menge des Überstandes und seinen pH-Wert. Von den Proben 1, 3

und 8 konnte kein Überstand gewonnen werden, bei Probe 7 mit 150 μ l zu wenig. Bei den verbleibenden 6 Proben lag der pH-Wert zwischen 0,4 und 7,2. Da bereits bei einer geringen Zugabe von Perchloressigsäure (PCA) 98% bis 99% des Proteins ausfallen, ließen sich die 6 Proben mit dieser Methode qualitativ auf den verbliebenen Eiweißgehalt untersuchen. Lediglich bei Probe 9 konnten wir nach PCA-Zugabe eine weitere Eiweißfällung beobachten. Um eine quantitative Aussage hinsichtlich der Proteinmenge machen zu können, untersuchten wir die Seren 2, 4, 5, 6 und 10 mit der empfindlicheren Lowry-Methode. Es zeigte sich, daß Probe 10 mit etwa 40 μ g/ml am wenigsten Eiweiß enthielt, gefolgt von den Proben 5, 6, 4 und 2. Allerdings sollten Chloride bei einem sauren pH des Eluenten nicht verwendet werden, da sie Teile der HPLC-Apparatur aus rostfreiem Stahl angreifen und deren Lebensdauer verkürzen.

Am geeignetsten erschien uns die Deproteinisierungstechnik der Probe 2. Zu 980 μ l Serum wurden 20 μ l Essigsäure 10%ig gegeben. Schütteln und fünf Minuten im Wasserbad kochen. Aus einem Milliliter Serum gewann man 500-600 μ l Überstand. Der pH-Wert betrug 7,2.

3.3.3. Ultraviolett-Spektrum von 5-Fluorouracil

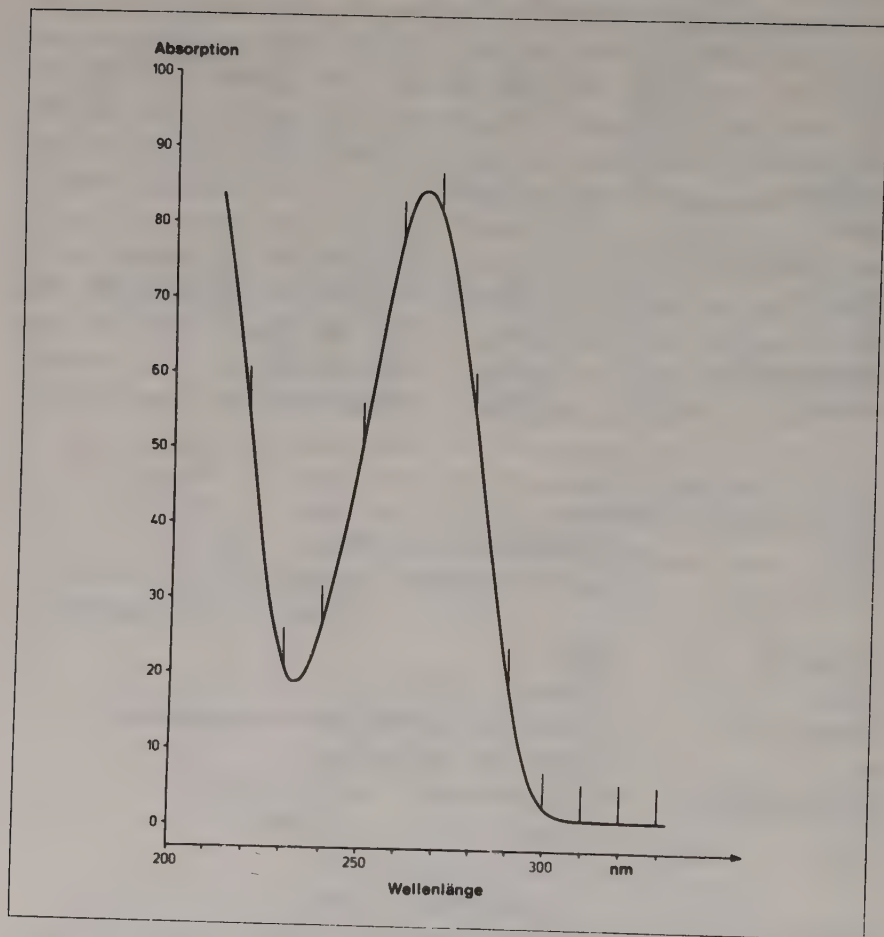


Abbildung 11: UV-Spektrum von 5-Fluorouracil.

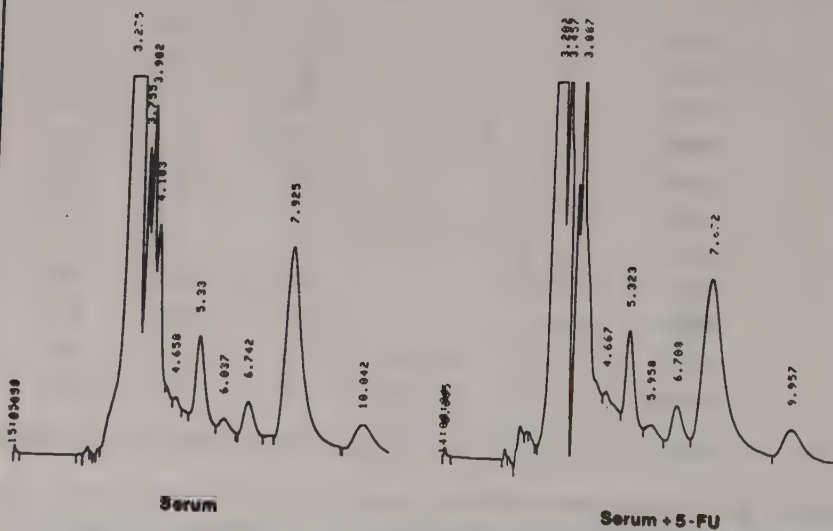
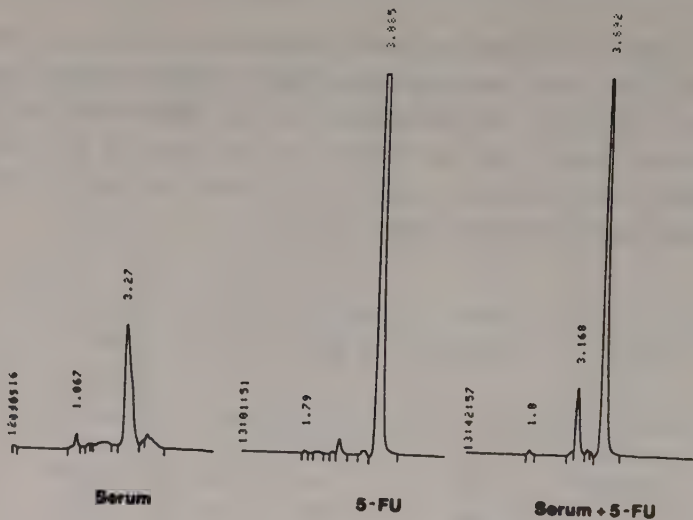
5-Fluorouracil hat bei 266 nm ein Absorptionsmaximum. Auf diese Wellenlänge wird der UV-Detektor der HPLC-Anlage eingestellt.

3.3.4. Optimierung der mobilen Phase

In Vorversuchen mit Fluorouracil-Reinsubstanz konnten wir zeigen, daß 5-FU auf einer Reversed-Phase-Säule (Shandon ODS Hypersil 5µm) bindet und mit Phosphatpuffer mit oder ohne Methanolzugabe eluiert werden kann. Für die Versuche zur Optimierung des Eluenten verwendeten wir eigenes Serum, das wie im Kapitel 3.3.2. beschrieben deproteinisiert wurde.

Eluent	KH ₂ PO ₄	Methanol	H ₂ O	pH	Flow ml/min	RT min
1	50mM	5%	-	5,0	0,8	2,9
2	-	50%	50%	5,3	0,8	1,8
3	-	30%	70%	5,0	0,8	3,9
4	50mM	-	-	3,2	0,8	8,2
4	50mM	-	-	3,2	1,0	6,5
4	50mM	-	-	3,2	1,2	5,4
5	50mM	-	-	3,0	1,2	5,3
6	10mM	-	-	3,0	1,0	6,3
6	10mM	-	-	3,0	1,2	5,3
7	10mM	-	-	5,0	1,2	5,3
8	10mM	5%	-	3,0	1,2	3,9
9	10mM	-	-	2,5	1,2	5,2
10	10mM	-	-	3,9	1,2	5,2
11	10mM	-	-	3,6	1,2	5,2

Tabelle 10: Einfluß der mobilen Phase auf den Trennvorgang und die Retentionszeit (RT) von 5-Fluorouracil. Trennsäule: Shandon ODS Hypersil 5µm, 150mm (Eluent 1-2) 250mm (Eluent 3-11), I.D. 4,5mm.



Nach Zugabe einer bekannten Menge 5-FU wurden 20 µl der Probe chromatographiert. Wir variierten die Molarität des Kaliumphosphatpuffers, den Methanolgehalt, den pH-Wert und die Fließgeschwindigkeit (Tab. 11). Die Methode mußte auch bei höchster Verstärkung eine gute Erkennbarkeit des 5-FU-Peaks gewährleisten.

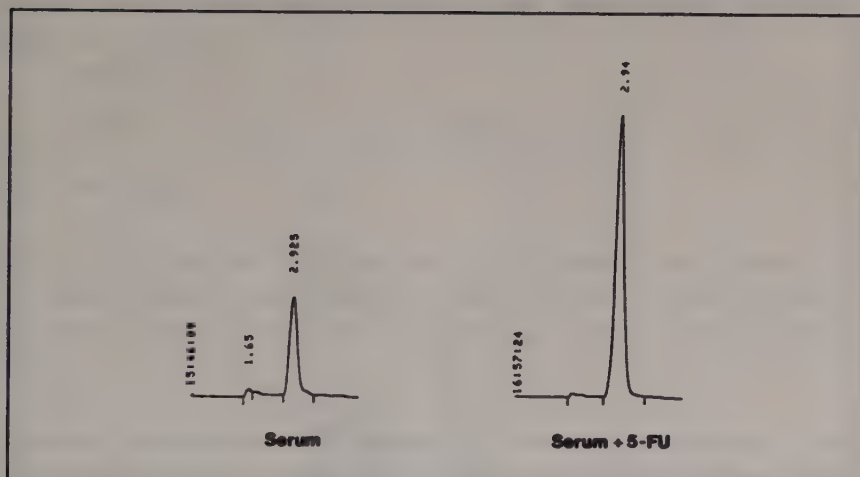


Abbildung 13: Chromatogramme mit Eluent 1
 KH_2PO_4 50mM 95% : Methanol 5%
 0,64 a.u.f.s., RT von 5-FU ist 2,9 min.

Abbildung 12: Chromatogramme mit Eluent 3
 Methanol 30% : Wasser 70%
 oben: Meßbereich 0,64 a.u.f.s., geringe Empfindlichkeit
 unten: Meßbereich 0,02 (links) und 0,01 a.u.f.s. (rechts),
 hohe Empfindlichkeit. Die Retentionszeit von 5-FU
 beträgt 3,88 Minuten.

Mit Eluent 3 erhielten wir ein für uns zufriedenstellendes Chromatogramm (Abb. 12 oben) im Meßbereich 0,64 a.u.f.s. (absorption units full scale). Die 5-FU-Konzentration war allerdings relativ hoch (mM). Bei niedriger Konzentration (μM) und einem Meßbereich von 0,01 a.u.f.s. erkannte man, daß viele unspezifische Serumpeaks zusammen mit 5-FU eluiert wurden (Abb. 12 unten). Der 5-FU-Peak mit einer Retentionszeit von 3,88 Minuten ließ sich nur ahnen, keinesfalls konnte man seine Fläche integrieren. Andere mobile

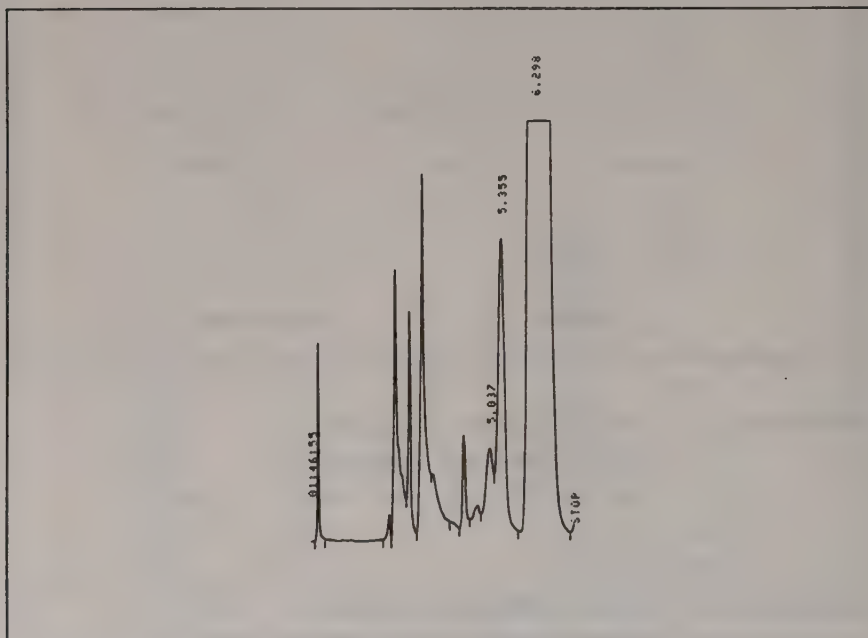


Abbildung 14: Chromatogramm mit Eluent 10
 KH_2PO_4 10mM, pH 3,9
 0,005 a.u.f.s., RT von 5-FU ist 5,35 min.

Phasen, vor allem die mit Methanol und höherem pH-Wert, eluierten zahlreiche Serums-substanzen zusammen mit 5-FU, das FU-Signal konnte dann nicht einmal bei hoher Konzentration identifiziert werden (Abb. 13).

Mit den Eluenten 4, 6, 10 und 11 erzielten wir die brauchbarsten Chromatogramme. Von diesen trennte der 10 mM Kaliumphosphatpuffer mit pH 3,9 am besten, zeigte die schmalsten Peaks und die stabilste Basislinie (Abb. 14).

3.3.5. Eichung

Obwohl der Integrator Daten längere Zeit speichern kann, haben wir vor jeder Meßserie neu geeicht. Dadurch werden Fehler minimiert, die durch schwankendes Bindungsvermögen der Säule entstehen können.

Mit einer Fluorouracil-Verdünnungsreihe ließ sich die Linearität der Eichkurve nachweisen (Abb. 15). Da sie durch den Nullpunkt geht, konnte man eine 1-Punkt-Kalibrierung mit Mittelwertbildung durchführen. Als Eichlösung verwendeten wir eine aus Reinsubstanz hergestellte wässrige Lösung mit einer millimolaren Konzentration. Von dieser wurden für die Kalibrierung drei mal 20 µl aufgetragen. Der Integrator mittelte die Retentionszeiten und die Peakflächen (oder wahlweise Peakhöhen) und legte damit die Eichkurve fest. Die Fluorouracil-Konzentration war der Peakfläche (bzw. -höhe) proportional. Verdünnungsfaktoren und etwaige Änderungen der Verstärkungsstufe mußten bei der endgültigen Berechnung natürlich berücksichtigt werden.

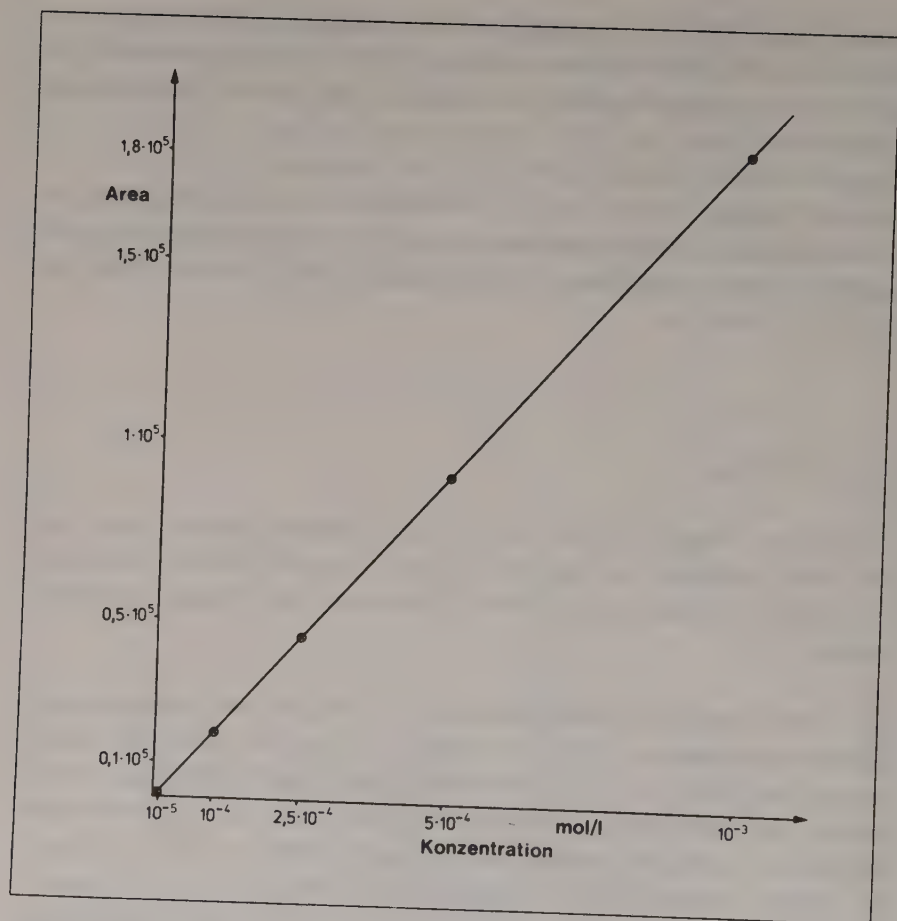


Abbildung 15: Eichkurve.

3.3.6. Stabilität von 5-Fluorouracil und Streuung der Meßwerte

Die meisten Serumproben wurden nicht sofort gemessen, sondern in Milliliterportionen bei -80°C eingefroren. Um das Serum vor der HPLC-Analyse zu enteiweißen, kochten wir es fünf Minuten. Die Frage war, ob beim Einfrieren und beim Kochen das Fluorouracil stabil ist, ob es zerfällt oder sich chemisch verändert.

Aus FU-Reinsubstanz wurde eine millimolare Lösung hergestellt. Ein Teil wurde sofort gemessen und ein anderer erst nach einer Kochzeit von fünf Minuten im Wasserbad. Eine weitere Portion wurde bei -80°C eingefroren, nach 4 Stunden aufgetaut, gemessen und anschließend für zwei Tage im Kühlschrank aufbewahrt. Dann wiederholten wir die Messungen, da wir auch klären wollten, ob sich 5-FU bei Zimmertemperatur beziehungsweise bei Kühlschranktemperatur nach längerer Aufbewahrung verändert.

Jede Probe wurde elf Mal gemessen (Tab. 11). Die Mittelwerte $\bar{x}$ betragen 1,0039, 1,0074, 1,0066, 1,0044, die zugehörigen Mediane $\tilde{x}$ 1,0035, 1,0063, 1,0083, 1,0045 mM. Die kleinste Spannweite war $15,3 \cdot 10^{-6}\text{M}$, die größte $21,8 \cdot 10^{-6}\text{M}$, das entspricht einer Schwankung von 1,5% bis 2,2% der Meßwerte der selben Proben. Die Mittelwerte differieren maximal um 0,35%, die Mediane um 0,48%. Kochen oder Einfrieren verursachen damit keine relevante Änderung der 5-Konzentration.

Messung	5-FU ----	5-FU Kochen	5-FU Frieren	5-FU Frieren+ Kühlen
1	1,0085	1,0003	0,9992	0,9958
2	1,0035	1,0002	0,9961	1,0045
3	1,0052	0,9955	1,0077	1,0065
4	1,0133	1,0058	1,0020	1,0019
5	0,9980	1,0039	1,0083	1,0024
6	1,0017	1,0084	1,0112	1,0023
7	1,0001	1,0063	1,0051	1,0049
8	0,9987	1,0148	1,0092	1,0059
9	1,0101	1,0124	1,0112	1,0038
10	1,0038	1,0160	1,0132	1,0111
11	1,0030	1,0173	1,0092	1,0093
$\bar{x}$	1,0039	1,0074	1,0066	1,0044
$\tilde{x}$	1,0035	1,0063	1,0083	1,0045
R	0,0153	0,0218	0,0171	0,0153
s^2	$2,2 \cdot 10^{-5}$	$4,7 \cdot 10^{-5}$	$2,7 \cdot 10^{-5}$	$1,5 \cdot 10^{-5}$
s	$4,7 \cdot 10^{-3}$	$6,8 \cdot 10^{-3}$	$5,2 \cdot 10^{-3}$	$3,9 \cdot 10^{-3}$
VK	0,47%	0,68%	0,51%	0,39%
$\bar{x}$	Mittelwert		s^2	Varianz
$\tilde{x}$	Median		s	Standardabweichung
R	Spannweite		VK	Variationskoeffizient

Tabelle 11: Streuung der Meßwerte und Stabilität einer millimolaren Lösung von 5-FU beim Kochen, Einfrieren und Aufbewahren.

3.3.7. Wiederfindung und untere Nachweisgrenze

Zu Vollblut wurde eine bekannte Menge Fluorouracil gegeben. Die Proben wurden in typischer Weise aufgearbeitet und chromatographiert. Der quantitative Nachweis von 5-FU ergab in allen Konzentrationsbereichen, daß die Fluorouracil-Konzentration im enteweißten Serum so hoch ist, wie die vorgegebene Konzentration im Vollblut. Fluorouracil muß sich also im Blut gleichmäßig verteilen und wird nicht im Serum angereichert. Man muß annehmen, daß es auch in die Erythrozyten aufgenommen wird. Aus diesem Grund haben wir bei der Leckberechnung (Kap. 4.3.3.) das Blutvolumen als primären Verteilungsraum angenommen und nicht etwa das Plasmavolumen.

Bei der Chromatographie von Blutproben mit fallender Fluorouracil-Konzentration wird die unvollständige Trennung des 5-FU-Peaks von einem kurz vorher erscheinenden Peak störender. Bei einer Konzentration von $2 \cdot 10^{-6} \text{M}$ ist das Peakhöhenverhältnis 1:1 und die Auflösung 0,7 - 0,8. Geringere FU-Konzentrationen sind als Schulter des Serumpeaks zu erkennen (Abb. 16). Eine quantitative Bestimmung läßt sich über die Peakhöhe durchführen. Die untere Nachweisgrenze liegt gering unter $1 \cdot 10^{-6} \text{M}$.

In Abbildung 16 sind Chromatogramme von Serumproben mit geringen Mengen Fluorouracil gezeigt. Die gleiche Fluorouracil-Konzentration als Reinsubstanz ergibt die darunter abgebildeten Peaks. Links eine Konzentration von $3,3 \cdot 10^{-6} \text{M}$ und rechts eine Konzentration von $0,7 \cdot 10^{-6} \text{M}$, im Serumchromatogramm nur als Schulter (Pfeil) zu erkennen.

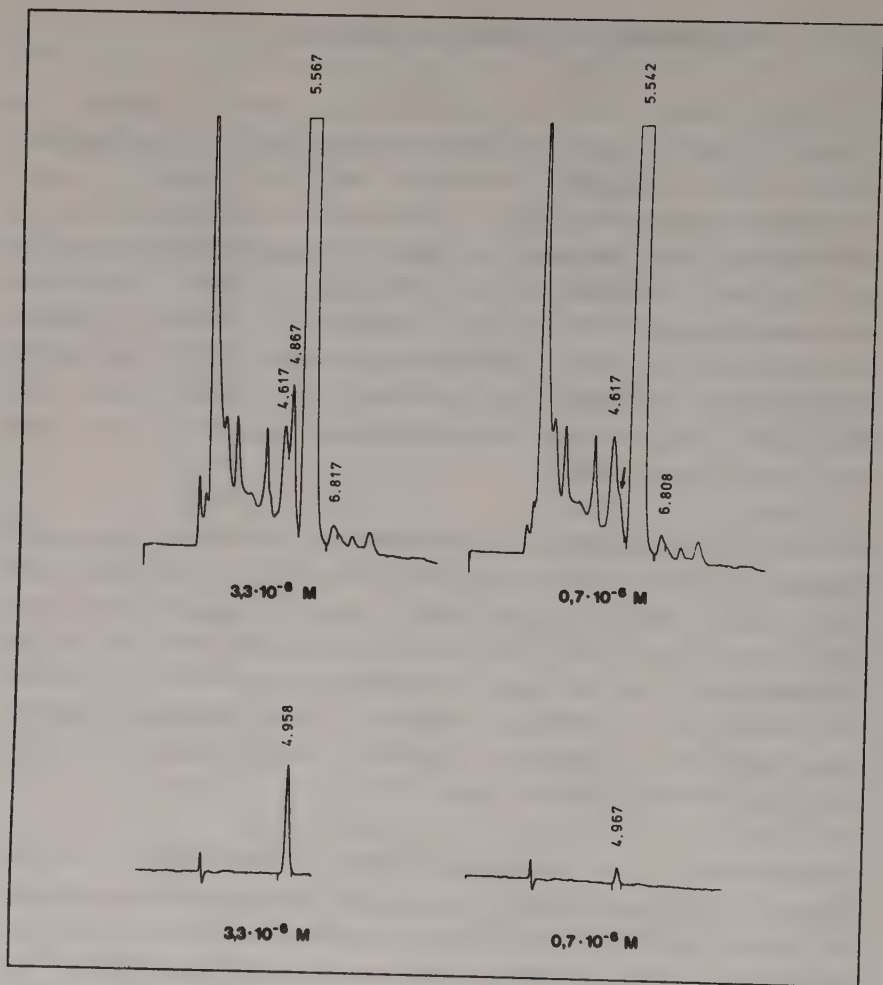


Abbildung 16: Untere Nachweisgrenze von 5-Fluorouracil. Reinsubstanz in wässriger Lösung (unten), gleiche Konzentration im Serum (oben). Bei einer Konzentration von $0,7 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ ist der Peak nur noch als Schulter (Pfeil) ausgeprägt. Vergleiche auch Leerwert-Chromatogramm S. 71.

4. ERGEBNISSE

4.1. Zusammenstellung der chromatographischen Bedingungen

Ein Schwerpunkt dieser Arbeit war der Aufbau einer Nachweismethode von 5-FU im Serum mittels der Hochleistungsflüssigchromatographie. Die durchgeführten methodischen Untersuchungen sind in den Kapiteln 3.3.2. bis 3.3.7. beschrieben. Unsere Verfahrensweise sei hier noch einmal kurz zusammengefaßt:

Probenaufbereitung

Blut	10 min zentrifugieren bei 3000 U/min
Serum	980 µl Serum + 20 µl Essigsäure 10%ig, schütteln und 5 Minuten im Wasserbad kochen
Überstand	1:1,5 mit Wasser verdünnen
Meß-Probe	20 µl injizieren

Chromatographische Bedingungen

Säule	Shandon ODS Hypersil 5µm, 250mm, I.D. 4,5mm
Wellenlänge	266 nm
Flow	1,2 ml/min
Eluent	KH_2PO_4 , 10 mM, pH 3,93; isokratische Elution

4.2. Leerversuch bei Normothermie und Hyperthermie

5-Fluorouracil ist beim Kochen oder Einfrieren stabil, sodaß keine meßbaren Konzentrationsänderungen bei solcher Behandlung auftreten. Im sogenannten Maschinenkreislauf simulierten wir die Perfusionsbedingungen weitgehend, lediglich die Leber fehlte. Wir wollten klären, ob sich Fluorouracil unter normothermen und hyperthermen Blutkreislaufbedingungen unterschiedlich verhält,

beziehungsweise unterschiedlich nachweisbar ist. Außerdem stellte sich die Frage, ob Fluorouracil an der Schlauchoberfläche oder im Oxygenator adsorbiert und deshalb in geringerer Konzentration in die Leber gelangen würde.

Das Zytostatikum wurde erst nach Erreichen der Versuchstemperatur im Lebermodell (=Gefäß) dem Kreislauf zugegeben. Über 90 Minuten

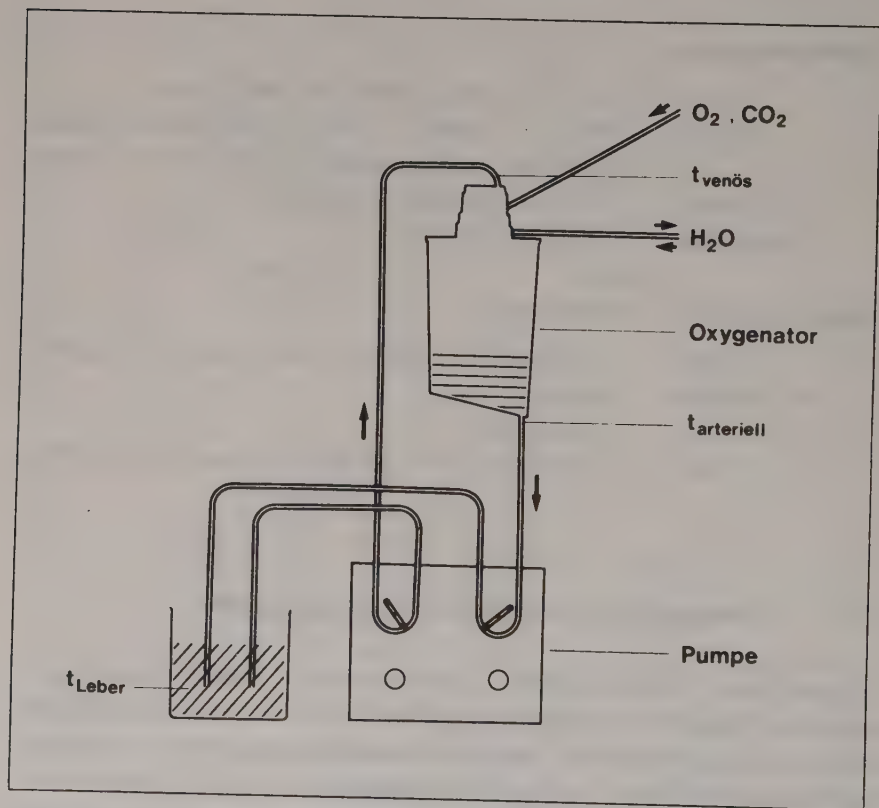


Abbildung 17: Schematische Darstellung des Perfusionskreislaufs.

wurden alle 10 Minuten die Temperaturen im arteriellen und venösen Schenkel und im Lebermodell gemessen, außerdem die Blutproben entnommen. Abbildung 17 zeigt schematisch die Versuchsanordnung.

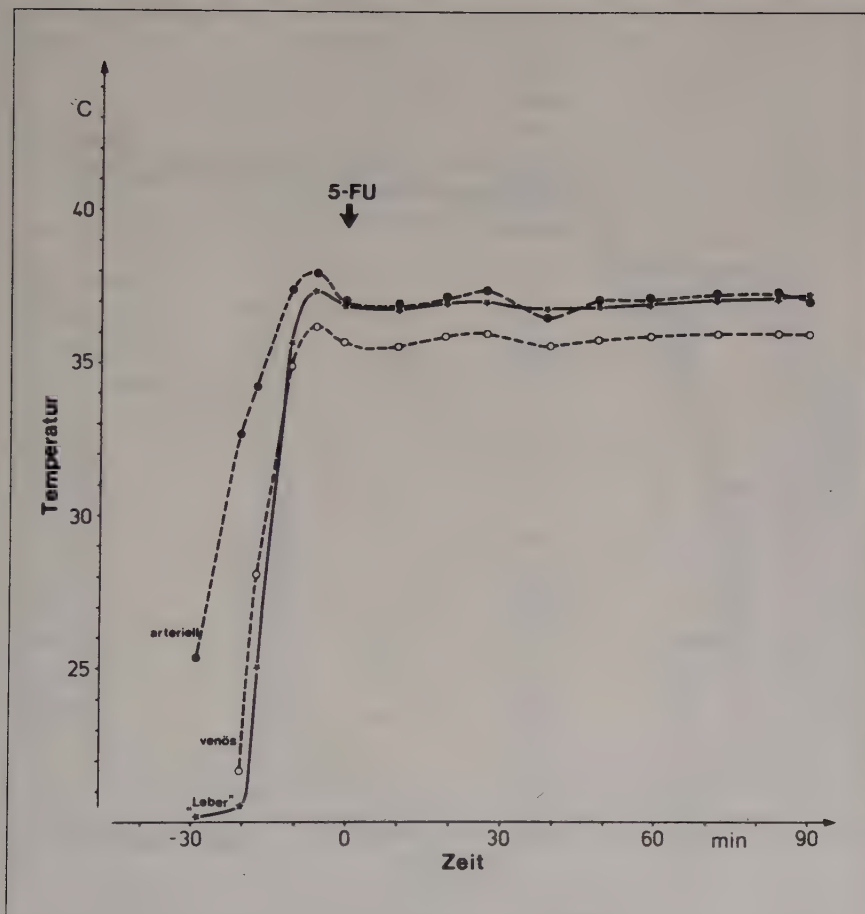


Abbildung 18: Temperaturverlauf bei Normothermie.

Den Verlauf der Temperaturkurven bei Normothermie (37°C) zeigt Abbildung 18, die Temperaturkurven bei Hyperthermie (41°C) sind in Abbildung 19 dargestellt.

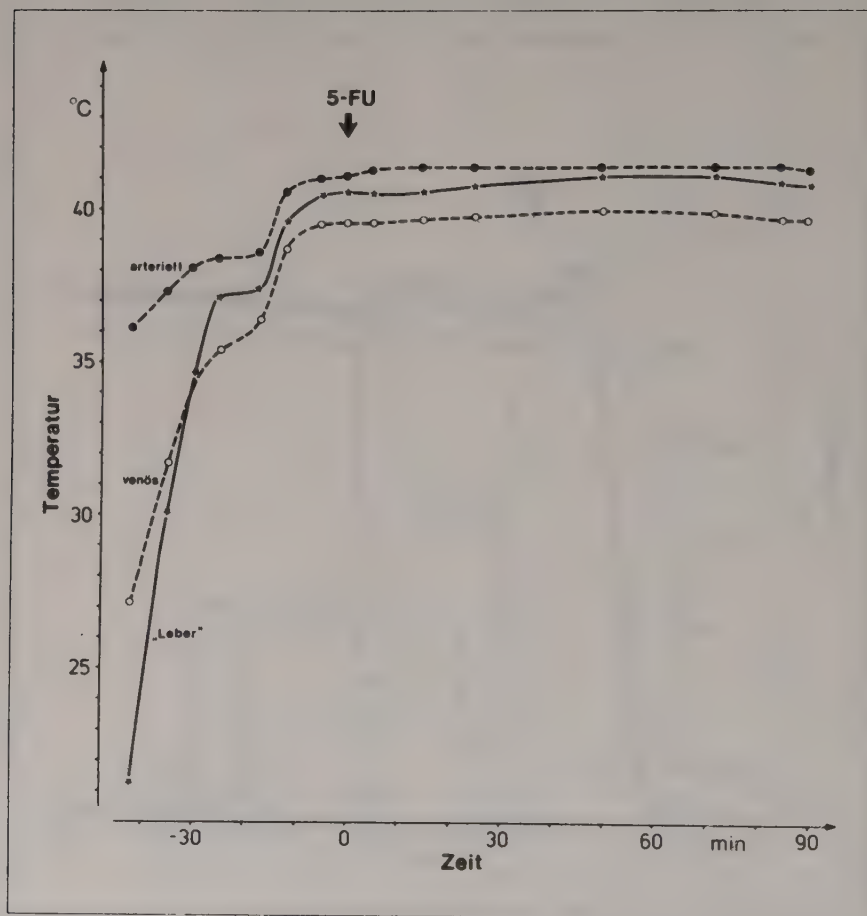


Abbildung 19: Temperaturverlauf bei Hyperthermie.

Bei vier Versuchsansätzen errechneten sich Fluorouracil-Konzentrationen zwischen 4,18 mM und 4,65 mM (Tab. 12). Der Mittelwert der gemessenen Konzentrationen lag bei 37°C um 2,6% und 1,5% und bei 41°C um 4,8% und 3,6% unter den theoretischen Konzentrationen. Anfängliche Schwankungen sind durch noch unvollständige Durchmischung erklärbar.

Versuch		1	2	3	4
		37°C	37°C	41°C	41°C
Berechnung					
Füllung	(ml)	1240	1431	1381	1421
5-Fluorouracil	(mg)	750	750	750	750
5-FU-Konzentration	(mM)	4,65	4,03	4,18	4,06
Messung					
Leerwert		0	0	0	0
2 min	(mM)	-	4,06	-	4,08
10 min	(mM)	4,57	3,94	3,78	3,58
20 min	(mM)	-	3,89	-	3,64
30 min	(mM)	4,32	3,99	4,29	4,01
60 min	(mM)	4,50	3,97	4,01	4,09
90 min	(mM)	4,71	3,99	3,91	4,05
$\bar{x}$	(mM)	4,53	3,97	3,98	3,91
Abweichung		2,6%	1,5%	4,8%	3,6%

Tabelle 12: Berechnung und Messung der 5-FU-Konzentration im Leerversuch bei Normothermie und Hyperthermie.

4.3. Meßergebnisse bei der isolierten Leberperfusion

4.3.1. Temperaturverlauf, Wärmeenergiegewinn und Sauerstoffverbrauch der Leber bei der ILP mit Hyperthermie oder Normothermie

Aus den protokollierten Flußraten läßt sich das Gesamtpumpvolumen einer Perfusion berechnen (Tab. 13). Dieses lag zwischen 19,1 und 46,9 Litern. Das Pumpvolumen pro Minute betrug 225 ml bis 521 ml.

Patient	Dauer	Fluß	Fluß	Gesamt-
	Minuten	A.hepatica	V.portae	pumpvolumen
		ml/min	ml/min	Liter
N.G. 1	57	300	170	26,8
S.O. 2	59	378	131	30,0
D.M. 3	55	311	156	25,7
S.W. 4	90	321	118	39,5
W.R. 5	90	358	163	46,9
Z.A. 6	85	0	225	19,1
Z.R. 7	73	145	147	21,3
Z.Al. 8	70	253	83	23,5
W.F. 9	70	350	160	35,7
H.A. 10	49	332	160	24,1
W.E. 11	90	251	183	39,1
Leer 37°C	90	450	-	40,5
Leer 41°C	90	450	-	40,5

Tabelle 13: Dauer und Flußrate des isolierten Kreislaufs bei den Perfusionen und Leerversuchen.

Bei der Patientin Z.A. (6) konnte aus anatomischen Gründen nur über die Vena portae perfundiert werden, der GesamtfLOW war dadurch niedriger, die Durchströmung der Pfortader jedoch höher als bei den anderen Patienten. Eine Perfusionszeit von 60 bis 90 Minuten wurde angestrebt, aber nicht immer erreicht. Bei Patient H.A. (10) mußten wir wegen Kreislaufproblemen des Patienten die Perfusion bereits nach 49 Minuten beenden.

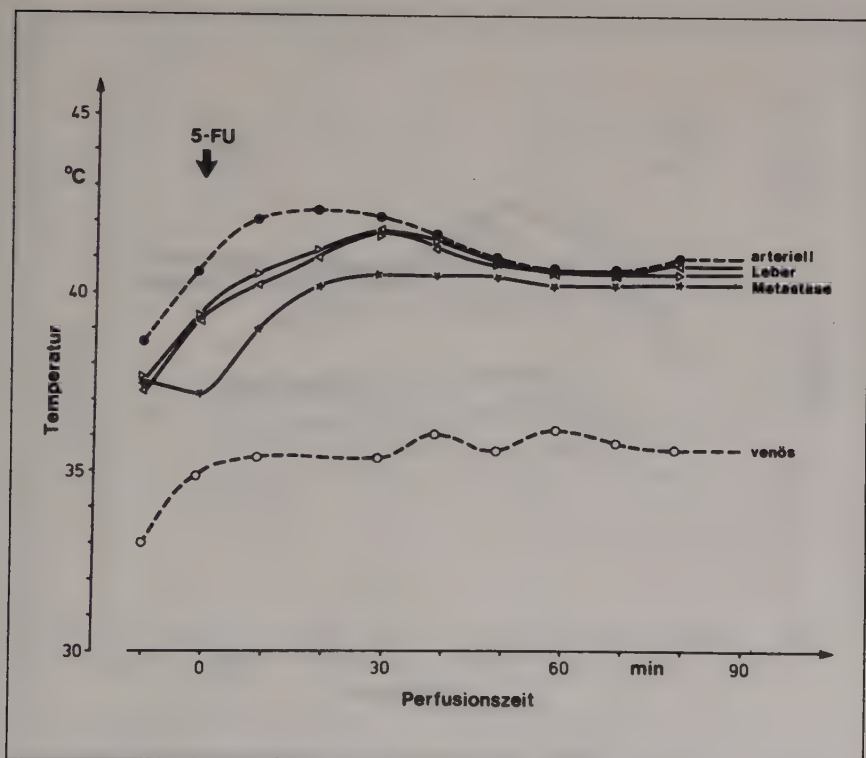


Abbildung 20: Temperaturverlauf beim Patienten S.W.(4).

Die Abbildungen 20 bis 23 zeigen Temperaturverlauf der Patienten S.W. (4), W.R. (5), S.O. (2) und W.E. (11). Die gestrichelten Linien entsprechen der Temperatur im arteriellen Schenkel (Symbol ●) und im venösen Schenkel (Symbol ○). Die Erwärmung des rechten Leberlappens (Symbol ▷) und des linken Leberlappens (Symbol ◁) ist mit durchgezogenen Linien dargestellt. Sterne (★) markieren die in einer Metastase gemessene Temperatur. Beim Patient S.W. (4) wurden beide Leberlappen und die Metastase relativ

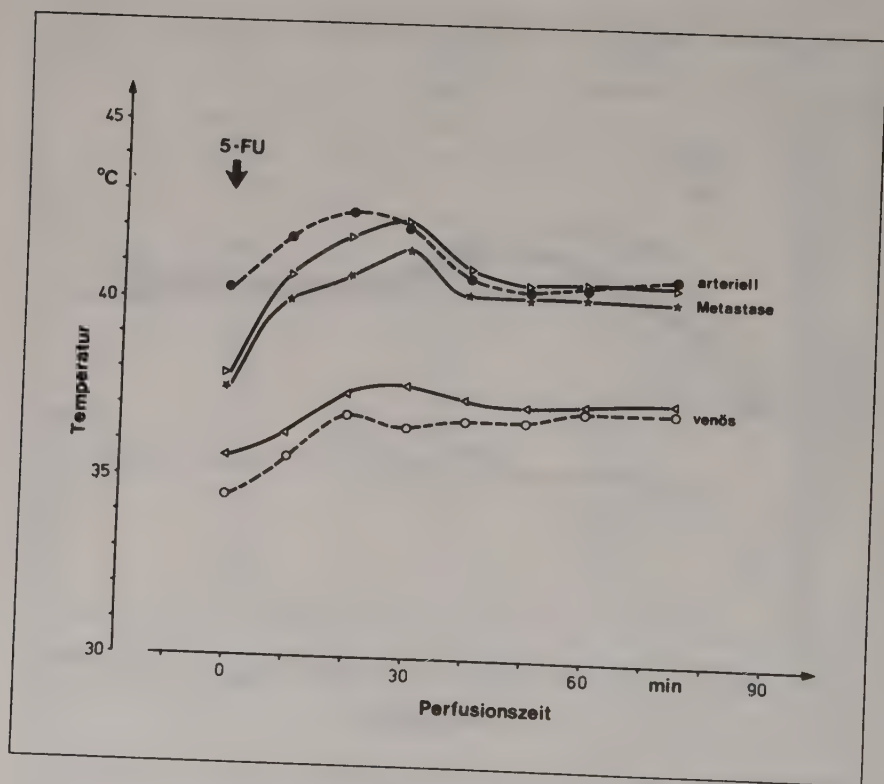


Abbildung 21: Temperaturverlauf beim Patienten W.R.(5).

gleichmäßig auf mehr als 40°C erwärmt (Abb. 20, Tab. 14). Beim Patient W.R. (5) ließen sich nur für die Metastase und den rechten Leberlappen erhöhte Temperaturen messen, mit einem Maximum von $42,2^{\circ}\text{C}$ im Lebergewebe und $41,5^{\circ}\text{C}$ in der Metastase. Der linke Leberlappen blieb normotherm (Abb. 21, Tab. 14). Dagegen blieb die Metastasentemperatur von Patient S.O. (2) unter 37°C , die im rechten Leberlappen lag durchschnittlich bei $39,6^{\circ}\text{C}$ (Abb. 22, Tab. 14).

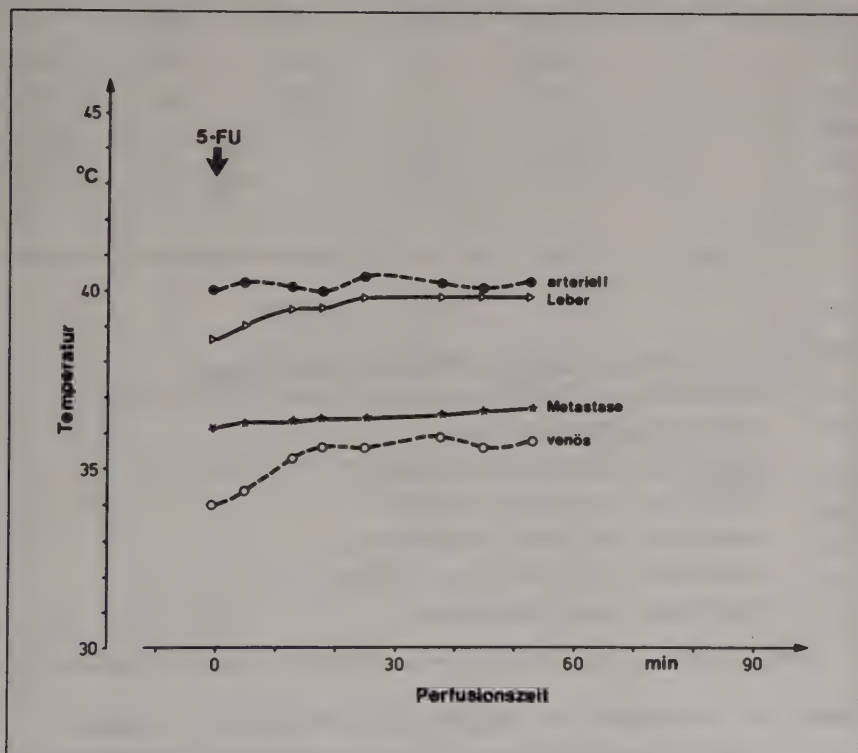


Abbildung 22: Temperaturverlauf beim Patienten S.O.(2).

Patient		H/N	t _{art} °C	t _{ven} °C	t _{liLL} °C	t _{reLL} °C	t _{Met} °C
N.G.	1	H	40,2	35,8	39,3	39,4	-
S.O.	2	H	40,2	35,4	-	39,6	36,5
D.M.	3	H	42,2	35,2	40,7	39,0	-
S.W.	4	H	41,4	35,7	40,9	40,9	40,0
W.R.	5	H	41,2	36,5	37,1	40,7	40,2
Z.A.	6	H	41,7	38,2	36,1	38,9	-
Z.R.	7	H	41,4	35,5	35,2	40,2	40,2
Z.Al.	8	H	41,5	37,7	40,1	40,6	39,8
W.F.	9	N	37,8	35,1	36,4	37,7	37,4
H.A.	10	N	37,5	34,3	-	37,7	38,0
W.E.	11	N	37,7	35,0	37,4	37,7	37,9
Leer	37°C	N	37,1	35,8	"37,0"	-	-
Leer	41°C	H	41,4	39,8	"40,9"	-	-
N/H	Normothermie/Hyperthermie						
t _{art}	Temperatur im arteriellen Schenkel						
t _{ven}	Temperatur im venösen Schenkel						
t _{liLL}	Temperatur im linken Leberlappen						
t _{reLL}	Temperatur im rechten Leberlappen						
t _{Met}	Temperatur in der Metastase						

Tabelle 14: Mittelwerte der Temperaturen während der Perfusion.

Die ILP der Patientin W.E. (11) führten wir unter Normothermie-Bedingungen durch (Abb. 23, Tab. 14). Der Wärmeverlust der Leber ließ sich mit einer Vorlauftemperatur unter 38°C ausgleichen. Die Lebertemperatur betrug im Mittel 37,6°C. Nach einer Gewebsentnahme aus der Metastase, in der die Temperatursonde lag, wurde thermokoaguliert. Die Metastasentemperatur stieg dabei kurzfristig auf 41,5°C an und fiel dann in wenigen Minuten wieder auf normale Werte ab.

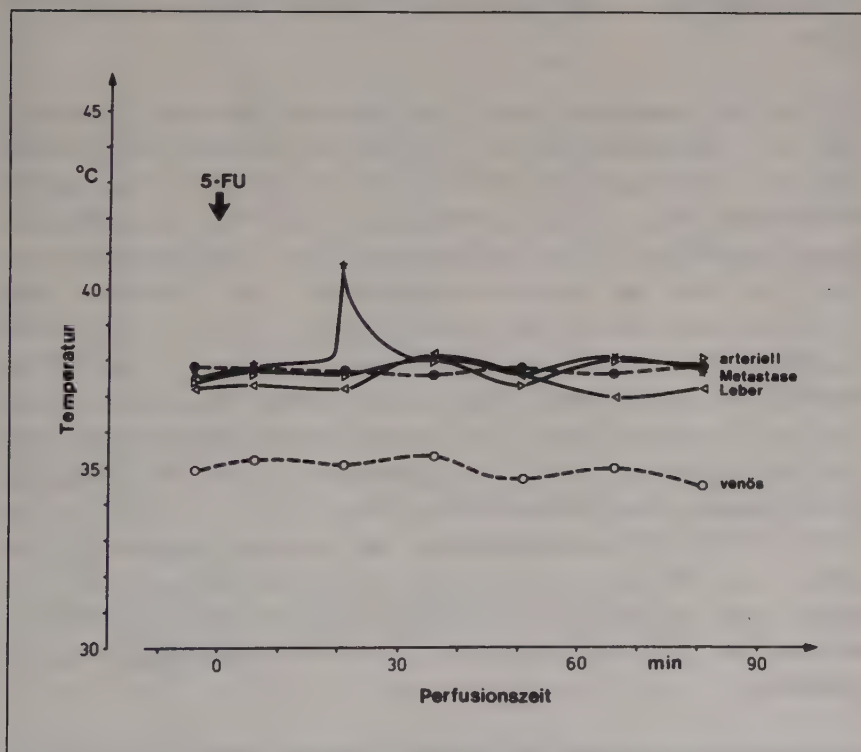


Abbildung 23: Temperaturverlauf bei der Patientin W.E.(11).

Man kann die dem System im Wärmeaustauscher des Oxygenators zugeführte Wärmemenge mit der Beziehung

$$\Delta Q = c \cdot m \cdot \Delta t$$

berechnen. Für die spezifische Wärmekapazität c von Blut kann der Wert $1,0 \text{ cal} \cdot \text{g}^{-1} \cdot ^\circ\text{C}^{-1}$ angenommen werden. Die Masse m ist das Gesamtpumpvolumen in Gramm, Δt die arterio-venöse Temperaturdifferenz (Tab. 15). Die Wärmemenge Q hat die Einheit Kalorie. Als traditionelle Energieeinheit der Wärmelehre entspricht sie derjenigen Wärmemenge, die 1 Gramm Wasser von $14,5^\circ\text{C}$ auf $15,5^\circ\text{C}$ aufheizt. Die Umrechnung in Joule erfolgt durch Multiplikation mit dem Faktor 4,186.

Ein Teil der zugeführten Wärme geht natürlich bereits im Oxygenator und im Schlauchsystem des extrakorporalen Kreislaufs wieder verloren. Wenn man für diesen Verlust die beim sogenannten Leerversuch (Kap. 4.2.) gemessene arterio-venöse Temperaturdifferenz annimmt, $1,2^\circ\text{C}$ bei 37°C -Kreislauf und $1,5^\circ\text{C}$ bei 41°C -Kreislauf, kann man den Wärmeenergiegewinn der Leber berechnen. Nach Division durch die Perfusionsdauer ergibt sich die pro Minute zugeführte Wärmemenge. Die Perfusionen 9, 10 und 11 wurden mit Normothermie durchgeführt. Nur um die Leber bei einer physiologischen Temperatur von 37°C zu halten, werden bereits 209 bis 265 Joule pro Minute und 100 g Lebergewebe verbraucht. Das entspricht dem Ausgleich einer Leberabkühlung von $0,5^\circ\text{C}$ bis $0,6^\circ\text{C}$ in der Minute. In den Berechnungen gehen wir von einem Lebergewicht von 1200 g bei Frauen und von 1500 g bei Männern aus [56]. Ab Patient S.W. (4) haben wir die Leber mit einer Wärmeisulationsfolie während der Perfusion abgedeckt, um den Abstrahlungsverlust zu verringern.

Stellt man die Abhängigkeit der Temperatur t von der Wärmemenge Q graphisch dar, ist eine breite Streuung um die Korrelationsgerade

Patient	Δt °C	ΔQ_{Gesamt} kJ	ΔQ_{Leber} kJ	ΔQ_{Leber} J/100g · min	t_{Leber} °C
N.G. 1	4,4	493,7	320,7	375	39,4
S.O. 2	4,8	598,6	405,0	458	39,6
D.M. 3	7,0	756,0	590,1	894	39,6
S.W. 4	5,7	942,2	687,5	509	40,9
W.R. 5	4,7	920,5	617,6	457	39,5
Z.A. 6	3,5	282,4	159,1	156	38,0
Z.R. 7	5,9	525,7	388,2	443	38,5
Z.Al. 8	3,8	376,2	224,5	214	40,4
W.F. 9	2,7	405,1	218,8	208	37,3
H.A. 10	3,2	320,7	195,0	265	37,7
W.E. 11	2,8	454,3	250,4	232	37,6

$$\Delta t = t_{\text{art}} - t_{\text{ven}}$$

$\Delta Q = c \cdot m \cdot \Delta t$

c ist die spezifische Wärmekapazität
 m ist die Masse (=Gesamtpumpvolumen)

$$\Delta Q_{\text{Leber}} = \Delta Q_{\text{Gesamt}} - m(\Delta t_{-1,2}) \text{ bei Normothermie}$$

$$\Delta Q_{\text{Leber}} = \Delta Q_{\text{Gesamt}} - m(\Delta t - 1,5) \text{ bei Hyperthermie}$$

t_{Leber} ist die durchschnittliche Temperatur der Leber

Tabelle 15: Arterio-venöse Temperaturdifferenz und Wärmeenergiegewinn der Leber.

zu erkennen ($r = 0,495$) (Abb. 24). Ein Grund mag sein, daß eine optimale, repräsentative Temperatursondenplatzierung schwierig ist. Wenn sie in unmittelbarer Nähe eines größeren Gefäßes liegt, wird sie eher höhere Werte anzeigen. Falls die Temperatur der ungenauere Parameter für den Energiegewinn der Leber ist, sollte der Sauerstoffverbrauch des Lebergewebes (Tab. 16) besser mit der

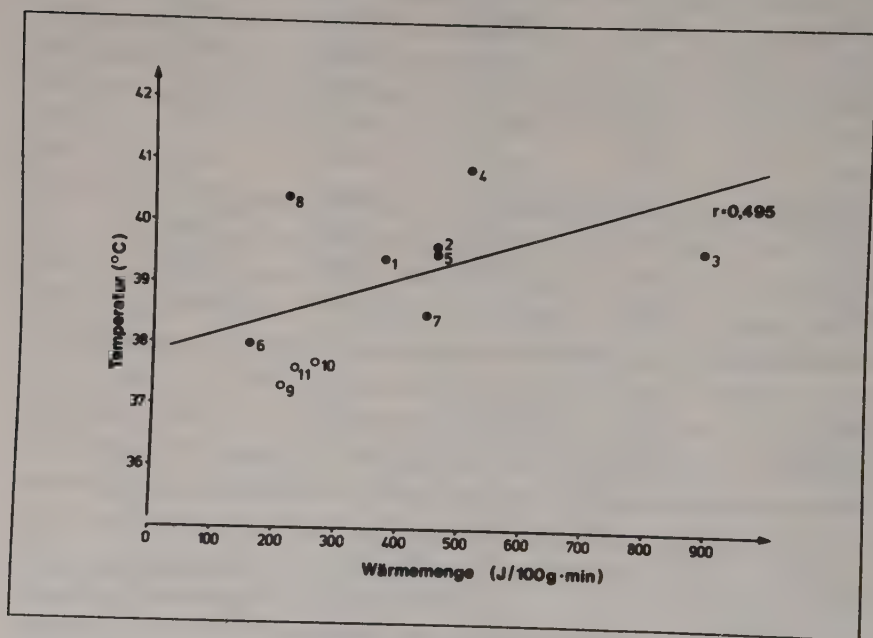
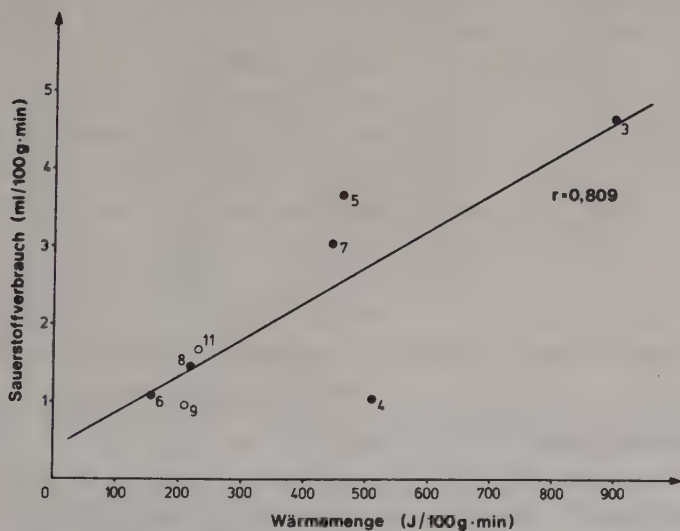
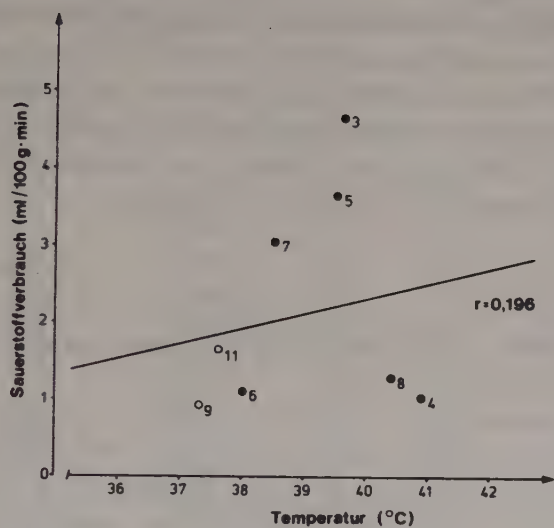


Abbildung 24: Durchschnittliche Lebertemperatur in Abhängigkeit von der zugeführten Wärmemenge. (● Hyperthermie, ○ Normothermie).

Abbildung 25: Sauerstoffverbrauch gegen die Temperatur des Lebergewebes (oben) und gegen die zugeführte Wärmemenge (unten) aufgetragen.



Patient		Durchblutung ml/100g min	O ₂ -Konzentration		avD _{O₂} Vol. %	O ₂ -Verbrauch V _{O₂} ml/100g · min
			art.	ven.		
D.M.	3	38	19,0	5,9	13,1	4,9
		38	21,1	9,7	11,4	4,4
S.W.	4	28	21,1	16,9	4,2	1,2
		27	17,3	14,0	3,3	0,9
W.R.	5	30	16,0	6,4	9,6	2,9
		33	21,3	9,3	12,0	4,0
		36	21,7	12,5	9,2	3,3
Z.A.	6	19	17,2	9,5	7,7	1,5
		19	17,5	11,9	5,6	1,1
		19	14,6	10,8	3,8	0,7
Z.R.	7	21	21,8	8,2	13,6	2,8
		21	21,6	7,5	14,1	2,9
		29	21,1	9,4	11,7	3,4
Z.A1.	8	23	16,7	10,6	6,1	1,4
		19	17,1	9,3	7,8	1,5
W.F.	9	34	20,5	17,6	2,9	1,0
		34	20,6	19,4	1,2	0,4
		34	21,0	18,5	2,5	0,9
W.E.	11	36	14,7	9,9	4,8	1,7
		36	14,6	10,2	4,4	1,6

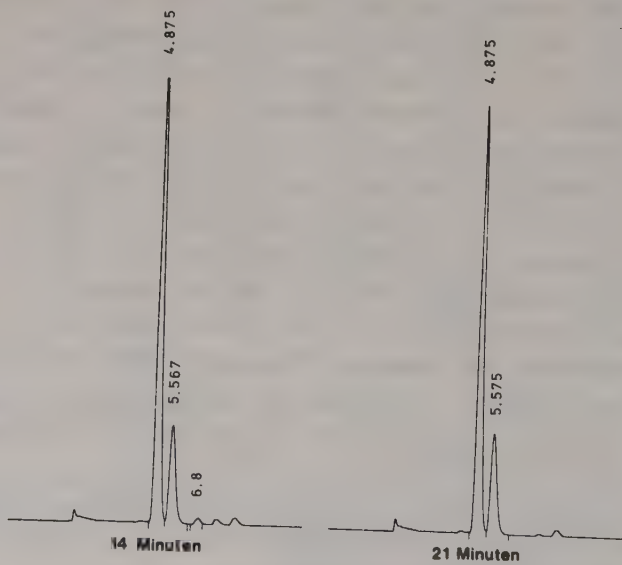
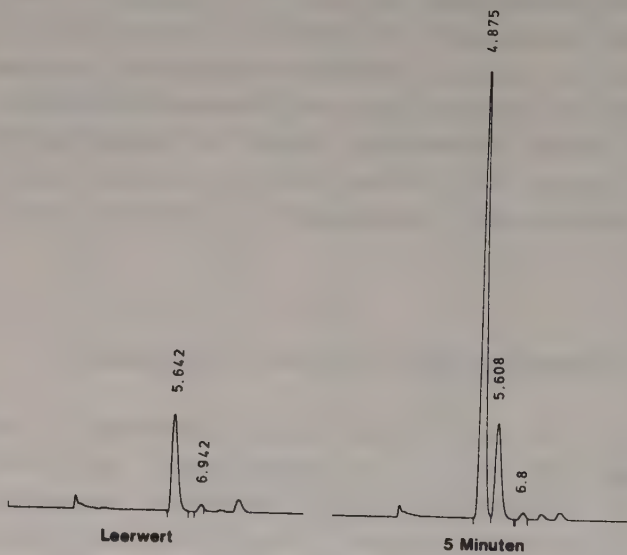
Tabelle 16: Durchblutung zum Zeitpunkt der Blutgasanalyse, Sauerstoffkonzentration im arteriellen und venösen Schenkel, arterio-venöse Differenz (avD_{O₂}) und Sauerstoffverbrauch pro Minute und 100 g Lebergewebe (Lebergewicht: ♂ 1500 g, ♀ 1200 g [56]).

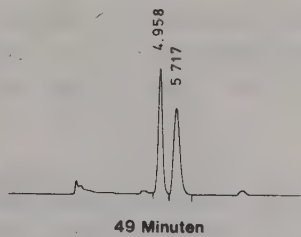
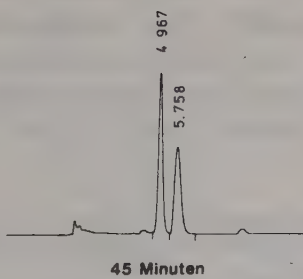
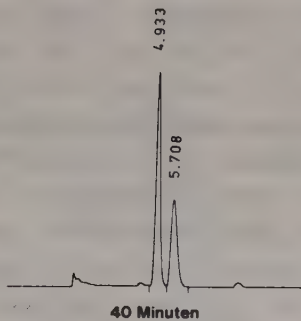
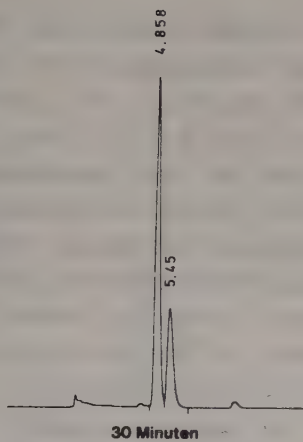
zugeführten Wärmemenge als mit den gemessenen Temperaturen korrelieren. Abbildung 25 zeigt diesen Zusammenhang. Der Korrelationskoeffizient im Sauerstoffverbrauch/Temperatur Diagramm beträgt nur 0,196, im Sauerstoffverbrauch/Wärmemenge Diagramm dagegen 0,809. In beiden Darstellungen haben die Regressionsgeraden eine positive Steigung, der Sauerstoffverbrauch nimmt also bei Erhöhung der Wärmeenergiezufuhr beziehungsweise Temperaturerhöhung zu.

4.3.2. Konzentration von 5-Fluorouracil im Perfusat

Als Beispiel für eine typische Chromatogrammsequenz sind in den Abbildungen 26 und 27 die Meßergebnisse des Patienten H.A. gezeigt. Die Peakgrößen lassen sich unmittelbar vergleichen, da alle Chromatogramme bei gleicher Verstärkung des Detektorsignals aufgezeichnet wurden. Die Retentionszeit von Fluorouracil ist im wesentlichen von den chromatographischen Bedingungen abhängig (s.a. Kap. 3.3.). Allerdings haben wir festgestellt, daß verschiedene Chargen des gleichen Säulentyps etwas unterschiedliches Bindungsvermögen haben können. So werden bei dieser Meßserie alle Substanzen etwa 0,5 Minuten eher eluiert (RT von 5-FU = 4,8-4,9 min), als bei den anderen Messungen (RT von 5-FU = 5,4 min). Im Chromatogramm des Leerwerts (Abb. 26 oben links) wird ein unspezifischer Serumpeak nach 5,6 Minuten eluiert. Fünf Minuten nach Zugabe der Zytostatika in den Perfusionskreislauf, läuft ein großer 5-FU-Peak vor besagtem Serumpeak (Abb. 26 oben rechts). Wenige Minuten später ist der Peak an der Spitze etwas breiter, das optische Korrelat einer höheren Konzentration (Durchmischungs-

Abbildung 26 (S. 68) und **Abbildung 27** (S. 69): Chromatogrammfolge der Fluorouracil-Messung im Perfusat.



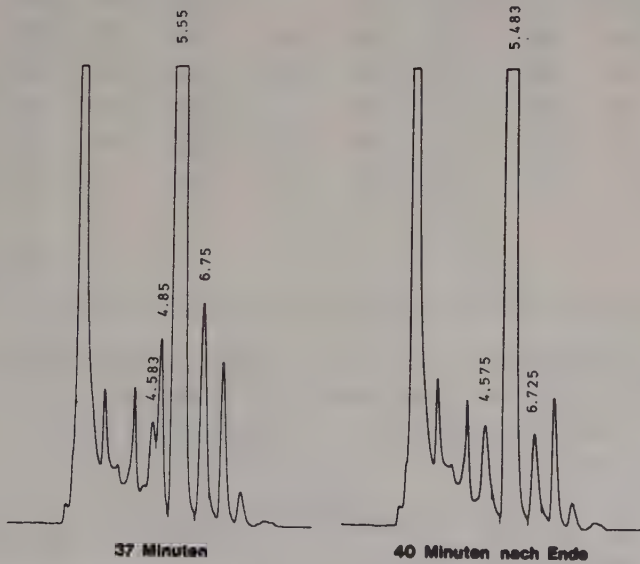
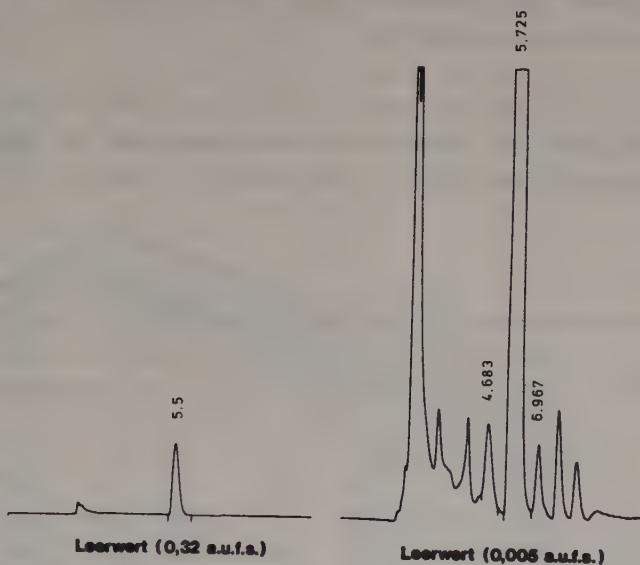


phänomen). In der Folge nimmt die Peakgröße kontinuierlich ab und ist nach 49 Minuten nur noch wenig größer als der Serumpeak, der in allen Chromatogrammen gleich groß bleibt.

Die Messungen der systemischen FU-Spiegel des gleichen Patienten sollen das Chromatogrammuster bei höchstempfindlicher Detektion zeigen (Abb. 28). Oben sind Chromatogramme des systemischen Leerwertes dargestellt. Links bei 0,32 a.u.f.s. (wie in den Abbildungen 26 und 27) und rechts 64 Mal empfindlicher bei 0,005 a.u.f.s.. Auch sehr kleine Peaks werden nun noch erfaßt. Im Chromatogramm unten links ist Fluorouracil nachweisbar (Perfusionszeit 37 Minuten). Der Peak mit einer Retentionszeit von 4,85 Minuten entspricht einer Konzentration von $3,6 \cdot 10^{-6} \text{ M}$, beziehungsweise 0,47 ng/ml. Bei Konzentrationen unter $5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ wird die Integration für den Rechner schwieriger und die Genauigkeit der Methode geringer, da der Peak der kurz vor dem FU eluierten Substanz immer stärker überwiegt. 5-FU-Konzentrationen unter $1 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ lassen sich aber noch als Schulter dieses Peaks erkennen (s.a. Kap. 3.3.7.). Das Chromatogramm einer 40 Minuten nach Perfusionsende entnommenen Probe entspricht dem des Leerwerts (Abb. 28 unten rechts). Fluorouracil ist nicht mehr nachweisbar.

Wie erwähnt, ist 2 Minuten nach Injektion des Zytostatikums 5-FU im Perfusat nachzuweisen, jedoch in niedrigerer Konzentration als nach 10 Minuten (Tab. 17, Abb. 29). Als Ursache ist eine unvollkommene Durchmischung anzunehmen. Die 2-Minuten-Abnahme erfolgt meist während der schnell zunehmenden Konzentration von 5-FU im zurückfließenden Blut. Immerhin kann man festhalten, daß selbst bei einem Startflow von 230 ml/min (Patientin Z.A.) bereits

Abbildung 28: Chromatogramme der Fluorouracil-Messung im systemischen Kreislauf (RT von 5-FU = 4,85 min).



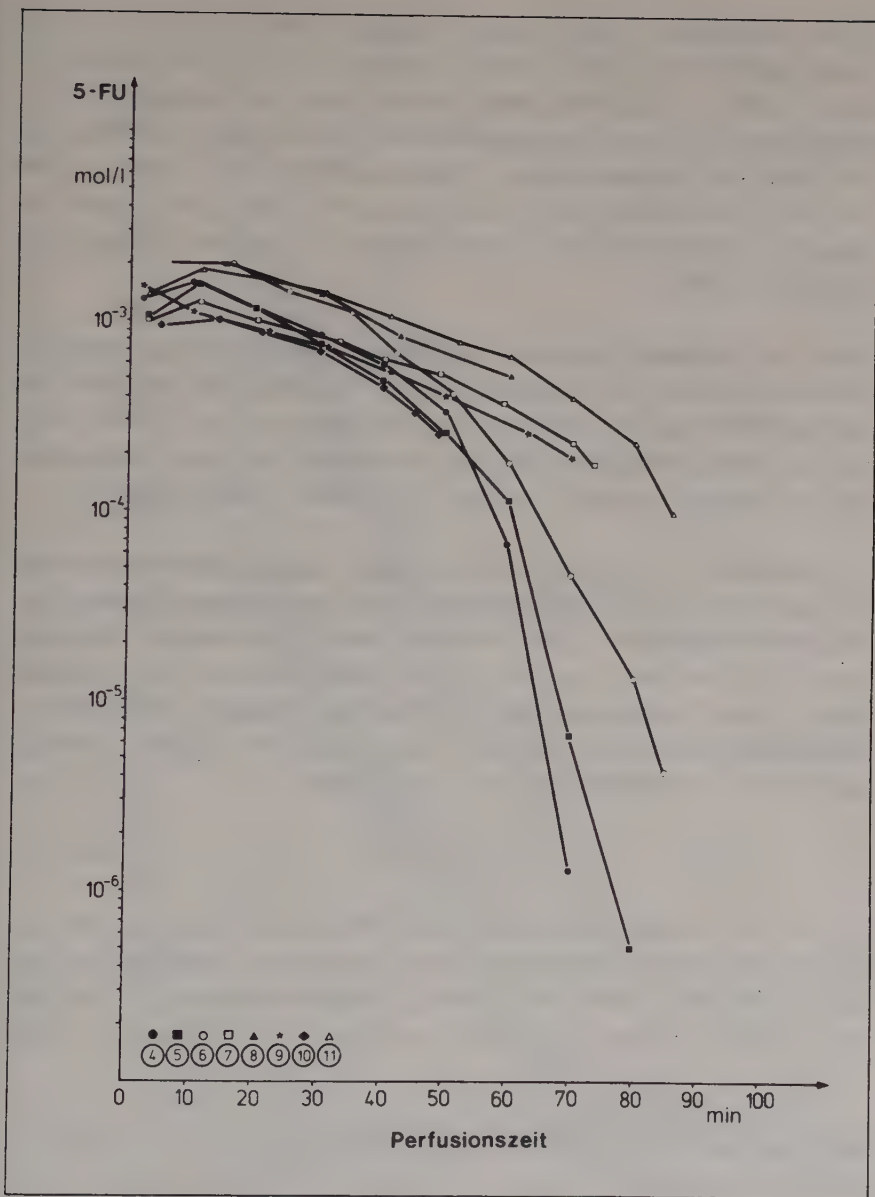
nach 3 Minuten der 5-FU-Bolus die Leber passiert hat und im venösen Schenkel nachweisbar ist.

Die Konzentration, mit der das 5-FU in die Leber eingeschwemmt wird, ist bei der ILP extrem hoch. Das Blutvolumen im Oxygenator beträgt anfänglich 400 - 900 ml. Bei rascher Verteilung der 750 mg

Patient	4	5	6	7	8	9	10	11	12
t	C								
min μ M									
Leerwert	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	1314	₃ 1066	₆ 1996	₃ 1020	-	1502	₅ 980	₃ 1345	₄ 162
10	1597	₁₁ 1551	₁₆ 2010	₁₁ 1254	₁₅ 1995	1108	₁₄ 1022	₁₁ 1867	₁₀ 64
20	1173	1175	₂₅ 1433	1003	-	₂₂ 868	₂₁ 901	₂₂ 1633	₁₆ 11
30	849	766	₃₅ 1138	₃₃ 793	1413	₃₁ 729	692	₃₁ 1396	₂₀ 0
40	601	487	₄₂ 684	643	₄₅ 839	₄₁ 554	458	₄₁ 1092	₃₅ 1070
50	337	259	₅₁ 410	₄₉ 535	-	417	₄₅ 339	₅₂ 796	₄₀ 1450
60	67	115	181	₅₉ 374	519	₆₃ 269	₄₉ 262	670	₄₅ 1160
70	1,3	6,6	46	₆₉ 236	-	195	-	409	₅₀ 1010
80	-	1,0	13	₇₃ 177	-	-	-	235	₅₅ 819
90	-	-	₈₅ 4,1	-	-	-	-	₈₆ 98	₆₀ 554

Tabelle 17: 5-FU-Konzentration (C) im Perfusat. Die kleingedruckte Zahl bedeutet die exakte Abnahmezeit (t) in Minuten, falls sie von der ersten Spalte abweicht (1 μ M = 0,13 μ g/ml).

Abbildung 29: Abnahme der Fluorouracil-Konzentration im Perfusat, semilogarithmische Auftragung.



5-FU entspricht das einer Konzentration von $14,4 \cdot 10^{-3} \text{M}$ ($=1,88 \text{ mg/ml}$) bis $6,4 \cdot 10^{-3} \text{M}$ ($=0,83 \text{ mg/ml}$), mit der das 5-FU in die Leber fließt. Diese hohen Werte fallen aber sehr schnell ab, da erstens das zu Beginn zurückkommende Blut verdünnt und zweitens ein noch zu diskutierender First-pass-Effekt für 5-FU in der Literatur beschrieben ist. Außerdem geht über ein Leck des isolierten Kreislaufs eine geringe Menge FU in den systemischen Kreislauf verloren.

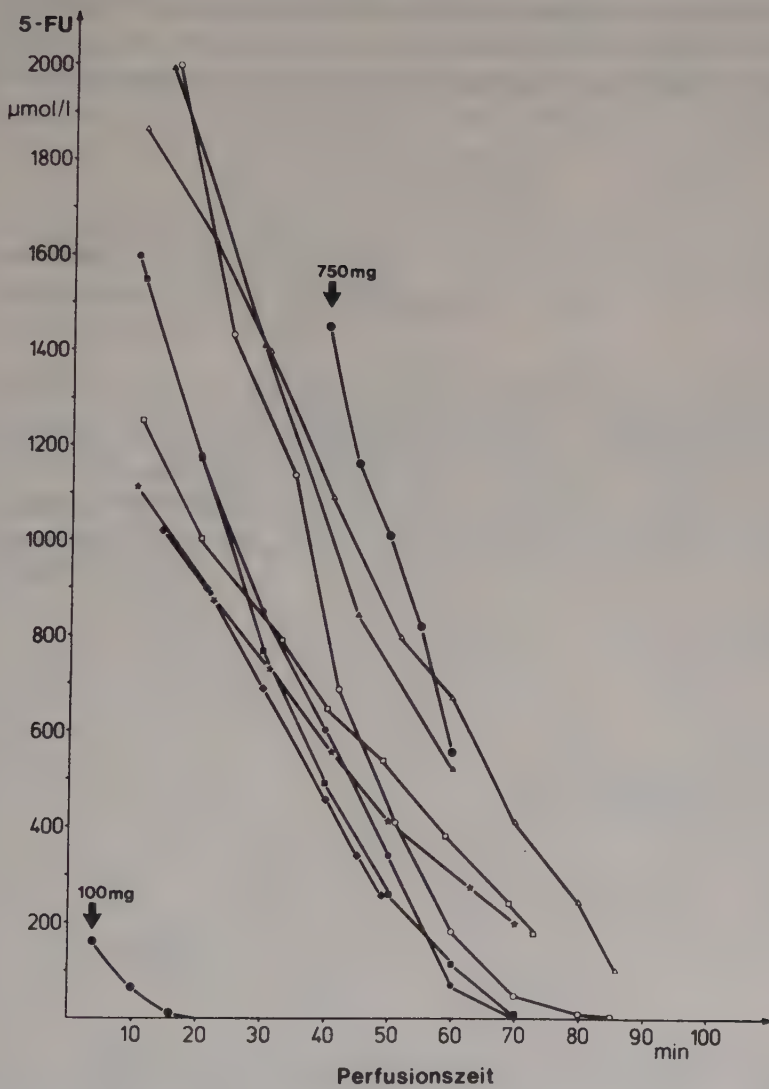
Wegen der besseren Überschaubarkeit des gesamten Konzentrationsbereiches von 5-FU im Perfusat sind in Abbildung 29 die Kurven im semilogarithmischen Koordinatensystem aufgetragen. Aus dieser Darstellung geht hervor, daß es sich anscheinend um keine Elimination nach 1. Ordnung handelt, da diese eine Gerade ergeben müßte.

In Abbildung 30 sind die gleichen Werte in ein Koordinatensystem mit linearer Ordinate eingezeichnet. Aus dem geraden Verlauf der Konzentrationsabnahme geht hervor, daß je Zeiteinheit dieselbe Menge 5-FU aus dem Perfusat entfernt wird. Die Größe der Änderung erfolgt dabei unabhängig von der Höhe der Konzentration. Definitionsgemäß handelt es sich also um eine Kinetik nullter Ordnung, mathematisch ausgedrückt durch die Beziehung

$$C = C_{01} - k_1 \cdot t_1 \quad (1)$$

C_{01} ist die Ausgangskonzentration, C die Konzentration zur Zeit t_1 und k_1 die Evasionskonstante. Eine derartige Verlaufsweise läßt sich beobachten, wenn ein aktiver Transportmechanismus oder ein das Substrat abbauende Enzym gesättigt ist. Der Umsatz erfolgt

Abbildung 30: Abnahme der Fluorouracil-Konzentration im Perfusat, lineare Auftragung.



dann mit maximaler Geschwindigkeit und ist konzentrations-unabhängig. Der relative Anteil der pro Zeiteinheit extrahierten Fraktion an der verbleibenden Substratmenge nimmt immer mehr zu, sodaß die Halbwertszeit proportional zur Substratmenge abnimmt. Es gilt

$$\frac{1}{2} C_{01} = C_{01} - k_1 \cdot T_{1/2}$$

$$T_{1/2} = \frac{C_{01}}{2 k_1} \quad (2)$$

Der zunächst gerade Verlauf geht allerdings bei einer bestimmten Grenzkonzentration in eine exponentielle Form über. Dies wird besonders bei den Kurven der Patienten S.W.(4), W.R.(5) und Z.A.(6) deutlich. Das heißt, daß ab dieser Grenzkonzentration das extraktionslimitierende System nicht mehr gesättigt ist. Deshalb erfolgt die FU-Abnahme in dieser Phase in Abhängigkeit von der Perfusatkonzentration. Dieser Verlauf wird Kinetik 1. Ordnung genannt und durch eine Exponentialfunktion beschrieben.

$$C = C_{02} \cdot e^{-k_2 \cdot t_2} \quad (3)$$

Für die Halbwertszeit gilt

$$\frac{1}{2} C_{02} = C_{02} \cdot e^{-k_2 \cdot T_{1/2}}$$

$$T_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_2} \quad \text{mit } k_2 = \frac{\ln \frac{C_{02}}{C}}{t_2} \quad (4)$$

Daraus geht hervor, daß die Halbwertszeit eine Konstante ist, folglich bei einer Kinetik 1. Ordnung von der Konzentration

unabhängig. Die graphische Darstellung ergibt im linearen Koordinatensystem eine Exponentialkurve, bei semilogarithmischer Auftragung eine Gerade. Die meisten biologischen Reaktionen und Evasionsvorgänge von Pharmaka verlaufen nach einer Kinetik 1. Ordnung. Die bekannteste Ausnahme ist der Abbau von Alkohol in der Leber, der nach einer Kinetik nullter Ordnung erfolgt [20].

In den folgenden Ausführungen wird versucht, die bislang hypothetische Zwei-Phasen-Kinetik von 5-FU bei der isolierten Leberperfusion mathematisch zu beschreiben und daraus pharmakokinetische Daten abzuleiten.

Die Bestimmung der Halbwertszeit ist bei pharmakokinetischen Untersuchungen von zentraler Bedeutung, da sie eine Konstante bei konzentrationsabhängigen Extraktionen ist. Sie wird mit den Gleichungen (3) und (4) berechnet. Andererseits sind bei einer Kinetik nullter Ordnung die Extraktionsraten konstant und eine Angabe der variablen Halbwertszeit nicht sinnvoll.

In Abbildung 31 sind alle 5-FU-Halbwertszeiten gegen die Perfusatkonzentration aufgetragen. Die Werte wurden in Abbildung 30 abgelesen, jeweils ausgehend von den in Tabelle 17 angegebenen 5-FU-Perfusatkonzentrationen. Bei höheren Konzentrationen streuen die Punkte um Geraden mit der Steigung 1, die die Halbwertszeiten bei einer konstanten Extraktionsrate widerspiegeln. $T_{1/2}$ nimmt bis zu einer bestimmten Konzentration deutlich ab, wird jedoch nicht kleiner als 2 bis 5 Minuten. Die kürzesten Halbwertszeiten wurden bei den Perfusionen der Patienten S.W.(4), W.R.(5) und Z.A.(6) gemessen.

Berechnet man die Halbwertszeiten der FU-Abnahme bei der Patientin Z.A.(6) mit den Gleichungen (2) und (4), so gilt keine der beiden Formeln im gesamten Konzentrationsbereich. Wenn Gleichung (4)

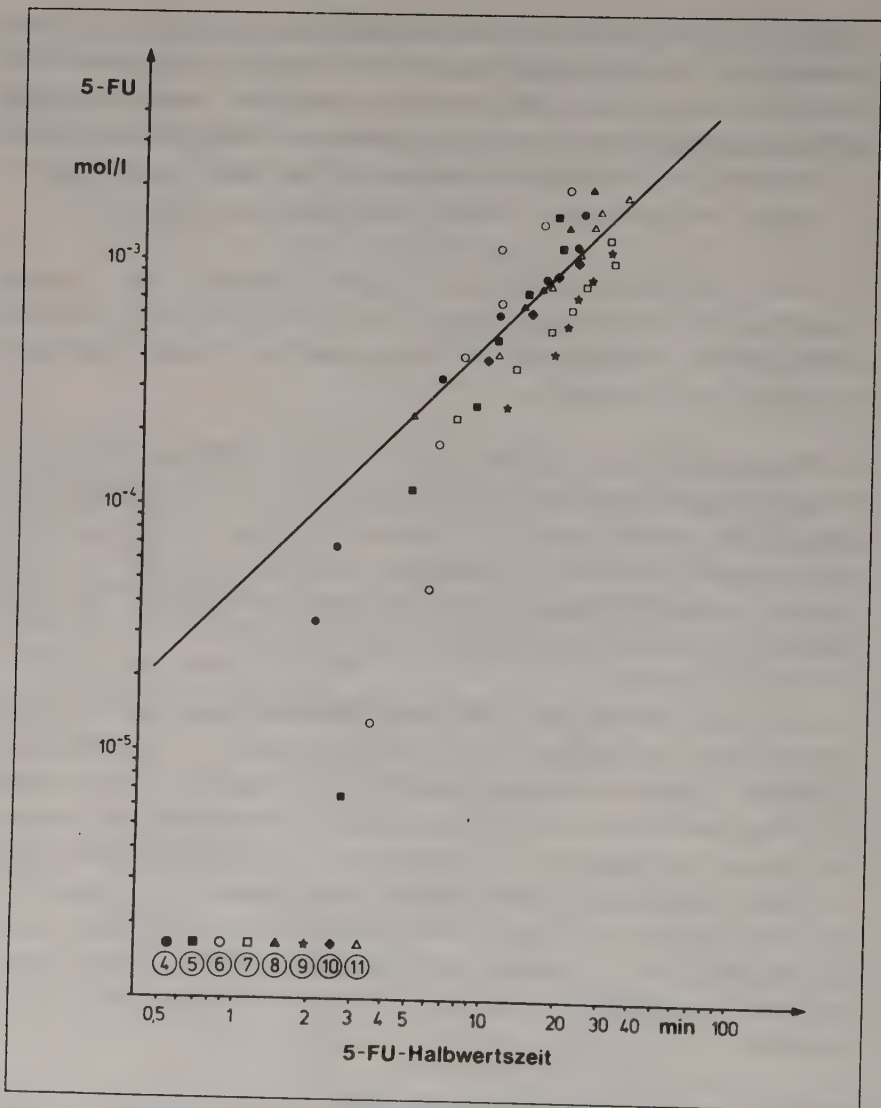


Abbildung 31: 5-FU-Halbwertszeiten in Abhängigkeit von der Konzentration. Bei konstanter Exsion ist die Geradensteigung 1.

gültig wäre, müßte man für $T_{1/2}$ konstante Werte erhalten (Tab. 18). Andererseits müßte die Halbwertszeit nach Gleichung (2) berechnet wesentlich stärker abnehmen, als in Wirklichkeit beobachtet werden kann. In der mittleren Spalte sind die der graphischen Darstellung entnommenen Halbwertszeiten aufgeführt, die der Wirklichkeit noch am nächsten kommen. Die Zahlenpaare im umrandeten Feld zeigen, in welchem Konzentrationsbereich die berechneten Werte am besten mit dem wahren Wert übereinstimmen. Bei hohen Konzentrationen ist für die Berechnung Gleichung (2), bei niedrigeren Gleichung (4) geeigneter.

Minuten	$T_{1/2} = \frac{C_0}{2(C_0 - C)} t$	$T_{1/2}$ aus Abb. 30	$T_{1/2} = \frac{\ln 2}{\ln \frac{C_0}{C}} t$
---------	--------------------------------------	-----------------------	---

10-20	21	21	18
20-30	15	16	30
30-40	12	11	10
40-50	7,1	11	12
50-60	4,2	8	7,6
60-70	1,9	6,5	5,1
70-80	0,1	3,5	3,0

Tabelle 18: 5-FU-Halbwertszeiten in Minuten während der Perfusion von Patientin Z.A.(6) mit verschiedenen Bestimmungsmethoden ermittelt. Links die Berechnung für eine Kinetik nullter Ordnung (Gleichung (2)), rechts für eine Kinetik erster Ordnung (Gleichung (4)), in der Mitte die aus der graphischen Darstellung entnommenen Werte. Im Kasten die Zahlenpaare mit der besseren Übereinstimmung.

In Abbildung 32 ist die Extraktionskurve der Patientin Z.A. in ein lineares und ein semilogarithmisches Koordinatensystem eingetragen. Sie liegt in beiden Fällen zwischen den Kurven, die mit den Gleichungen (1) und (3) bei gleicher Anfangssteigung festgelegt sind. In der halblogarithmischen Darstellung müßte eine Kinetik nullter Ordnung in der Endphase wesentlich steiler abfallen, während die Kinetik 1. Ordnung eine Gerade ergeben würde. Im linearen System verläuft die Extraktionskurve bei niedriger Konzentration asymptotisch. Würde diese Exponentialfunktion auch am Perfusionsbeginn gelten, müßte die Anfangskonzentration im Perfusat selbst die Ampullenkonzentration von 5-FU übertreffen.

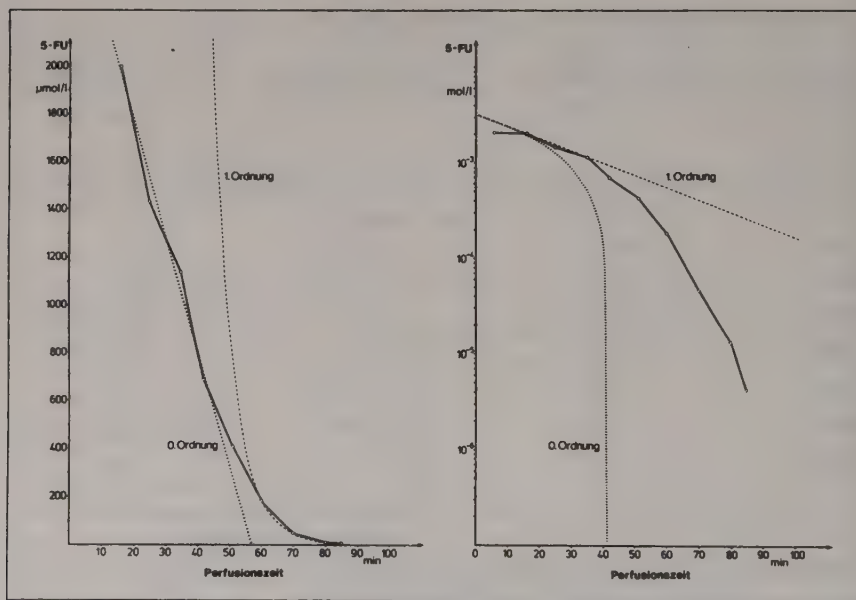


Abbildung 32: Lineare und semilogarithmische Auftragung der Extraktionskurve der Patientin Z.A.(6). Die gepunktete Linie markiert den Verlauf einer Kinetik nullter Ordnung, die gestrichelte den einer Kinetik erster Ordnung.

Bei einer zweiphasigen Kinetik ist natürlich der Übergangspunkt von besonderem Interesse. An diesem Punkt geht der lineare Kurvenverlauf in einen exponentiellen über. Er entspräche nach unserer Hypothese einer 5-FU-Konzentration, die die Sättigungskonzentration des Extraktionssystems bedeutet.

Wie beschrieben ist die Extraktionsgerade definiert durch die Gleichung (1)

$$C = C_0 - k_1 \cdot t_1$$

Der Konstantenterm C_0 entspricht der 5-FU-Anfangskonzentration im Perfusat. Da die Konzentration C mit zunehmender Zeit abnimmt, ist der Regressionskoeffizient beziehungsweise die Extraktionskonstante k_1 negativ. Ihre Größe bestimmt die Steigung der Extraktionsgeraden, die mit der Regressionsanalyse berechnet werden kann. Für den Korrelationskoeffizienten r ergeben sich Werte von 0,989 bis 0,999, was einen sehr starken linearen Zusammenhang der Merkmale Zeit und Konzentration bedeutet (Tab. 19).

Die Extraktionskonstante k_1 gibt die molare Konzentrationsänderung pro Minute an. Dieser Wert sagt jedoch noch nichts über die maximale Extraktionsgeschwindigkeit $V_{\max}$ für 5-FU aus, die der Eliminationskapazität der Leber und/oder Metastasen entspricht. Von der Anfangskonzentration C_0 (Tab. 19) kann man unter der vereinfachenden Annahme einer sehr raschen Durchmischung das FU-Verteilungsvolumen V_{vol} ableiten.

$$V_{\text{vol}} = \frac{\text{eingesetzte Menge 5-FU (750 mg)}}{C_0 \cdot \text{Molekulargewicht 5-FU (130,08 mg/mmol)}} \quad (5)$$

Eine weitere Voraussetzung für die Retropolation ist, daß die

Patient	n	C_0	k_1	r
		$\frac{\mu\text{mol}}{\text{l}}$	$\frac{\mu\text{mol}}{\text{l} \cdot \text{min}}$	
S.W. 4	5	1839	31	-0,993
W.R. 5	5	1853	33	-0,992
Z.A. 6	4	2740	48	-0,989
Z.R. 7	7	1376	17	-0,994
Z.Al. 8	4	2442	33	-0,992
W.F. 9	5	1264	17	-0,999
H.A. 10	6	1351	22	-0,999
W.E. 11	8	2132	24	-0,998

Tabelle 19: Berechnung der Anfangskonzentration C_0 und der Extraktionskonstanten k_1 . Regressionsanalyse mit n Wertepaaren.

Diffusion keine entscheidende Rolle spielt. Nach dem 1. Fickschen Gesetz ist die diffundierende Stoffmenge proportional zur Konzentrationsdifferenz, was anfangs einen schnellen Abfall bedeuten würde, der sich immer mehr verlangsamt. Deshalb würden die Extraktionsgeraden in Abbildung 30 "durchhängen", wenn die Diffusion deutlichen Anteil an der FU-Abnahme hätte. Der gerade Verlauf ab dem bekannten 10-Minuten-Wert macht dies eher unwahrscheinlich. So ergeben sich für C_0 Werte von $1,3 \cdot 10^{-3}$ bis $2,7 \cdot 10^{-3}$ mol/l.

Vernachlässigt man den Verlust von 5-FU aus dem System, der in drei Fällen über 10% lag (Tab. 24), verteilen sich die 750 mg 5-FU in Volumina von 2,1 - 4,5 Litern. Ob dafür eine unterschiedlich ausgeprägte Hepatomegalie in Frage kommt und welche intra-

hepatischen Verteilungsräume zur Verfügung stehen ist noch nicht klar (s.a. Messungen mit Evans Blue in Kap. 4.3.3.).

In diesem Zusammenhang sind die Ergebnisse des zuletzt perfundierten Patienten erwähnenswert, der in dieser Arbeit sonst nicht mehr berücksichtigt wurde. Bei ihm wurden zu Beginn der Perfusion 100 mg Fluorouracil injiziert und 30 Minuten später weitere 750 mg (Abb. 30). Auf diese Weise konnten wir auch in diesem Fall den konzentrationsabhängigen Beginn der exponentiellen Phase beobachten, die sich nur nach dem ersten Bolus nachweisen ließ. Nach Zugabe von 750 mg FU war das Extraktionssystem gesättigt und der Abfall linear. Bei diesem Patienten war das Verteilungsvolumen für 100 mg FU 3,1 Liter und für 750 mg FU 3,26 Liter. Es zeigten sich also keine konzentrationsbedingten Unterschiede, was wiederum gegen nennenwerte Diffusion spricht.

Die Eliminationskapazität der Leber E_k ergibt sich durch Multiplikation des Verteilungsvolumens mit der molaren Konzentrationsabnahme pro Minute.

$$E_k = V_{\text{vol}} \cdot k_1 \quad (6)$$

In Tabelle 20 ist E_k in $\mu\text{mol/min}$ und mg/min angegeben. Die Werte für $\bar{x} + s_{n-1}$ der E_k liegen bei Hyperthermie-Perfusionen um 14% höher ($90,2 \pm 14,8 \mu\text{mol/min} = 11,7 \pm 1,9 \text{ mg/min}$) als bei Normothermie-Perfusionen ($79 \pm 14,5 \mu\text{mol/min} = 10,3 \pm 1,9 \text{ mg/min}$), was statistisch keinen Unterschied bedeutet.

Die Eliminationskapazität E_k ist der limitierende Faktor für die FU-Extraktion. Als gesättigtes System ist sie durch weitere FU-Erhöhung nicht zu steigern. Allerdings muß das FU-Angebot so hoch sein, daß das Extraktionssystem auch ausgelastet ist. Das FU-Angebot ist abhängig von der Perfusatkonzentration C und der

Patient		H/N	V_{vol}	E_k	E_k	Flow	C_{Sp}
			l	$\frac{\mu mol}{min}$	$\frac{mg}{min}$	$\frac{l}{min}$	$\frac{\mu mol}{l}$
S.W.	4	H	3,14	97	12,7	0,40	243
W.R.	5	H	3,11	104	13,5	0,54	192
Z.A.	6	H	2,10	101	13,1	0,23	438
Z.R.	7	H	4,19	71	9,3	0,35	204
Z.Al.	8	H	2,36	78	10,1	0,28	278
W.F.	9	N	4,56	78	10,1	0,51	152
H.A.	10	N	4,27	94	12,2	0,49	192
W.E.	11	N	2,70	65	8,4	0,44	147

n		Eliminationskapazität $E_k : \bar{x} \pm s_{n-1}$			
Perfusionen	8	86 $\pm$ 14,8	$\mu mol/min$	=	11,2 $\pm$ 1,9 mg/min
Hyperthermie	5	90 $\pm$ 14,8	$\mu mol/min$	=	11,7 $\pm$ 1,9 mg/min
Normothermie	3	79 $\pm$ 14,5	$\mu mol/min$	=	10,3 $\pm$ 1,9 mg/min
V_{vol}	Verteilungsvolumen für 5-FU im isolierten Kreislauf				
E_k	Eliminationskapazität der Leber				
C_{Sp}	5-FU-Konzentration im Perfusat am Sättigungspunkt des Extraktionssystems				

Tabelle 20: Eliminationskapazität der Leber für 5-Fluorouracil.

Fließgeschwindigkeit F des extrakorporalen Kreislaufs.

$$5\text{-FU-Angebot} = C \cdot F \quad (7)$$

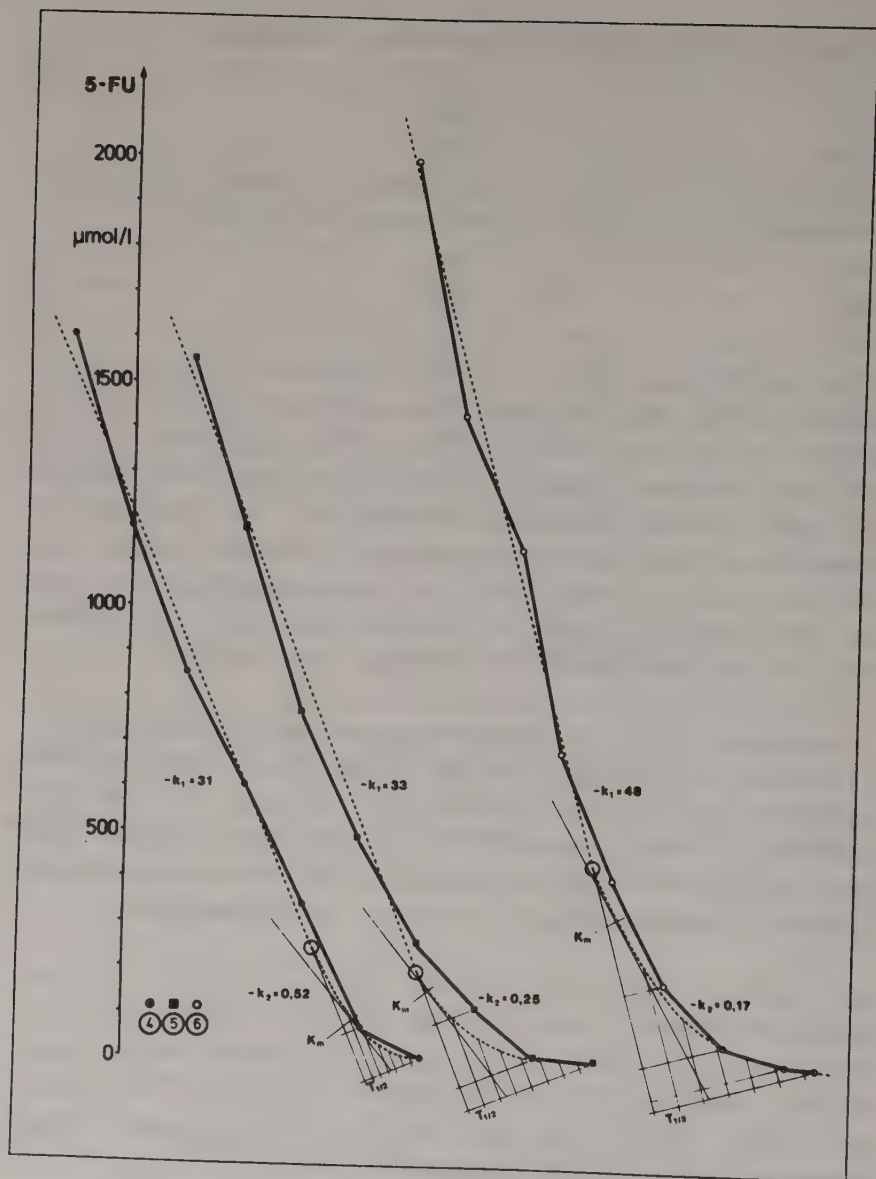
Am Sättigungspunkt C_{Sp} ist das Produkt $C \cdot F$ gleich der Eliminationskapazität E_k . Für die FU-Konzentration gilt folglich

$$C_{Sp} = \frac{E_k}{F} \quad (8)$$

In den Berechnungen muß der Wert des aktuellen Flows berücksichtigt werden, der aber bei einmal laufender Perfusion meist konstant gehalten werden kann (Tab. 20). Auf diese Weise läßt sich C_{Sp} auch dann berechnen, wenn die Konzentration während der Perfusion gar nicht so weit abgefallen (Perfusionen 8, 9, 10) oder die exponentielle Phase in der graphischen Darstellung noch nicht erkennbar ist (Perfusionen 7, 11). Die Perfusatkonzentration C sollte also immer über C_{Sp} liegen, da mit dem Beginn der exponentiellen Phase die pro Minute extrahierte FU-Menge rasch abnimmt.

In Abbildung 33 sind die Extraktionskurven der Patienten S.W.(4), W.R.(5) und Z.A.(6) abgebildet. Die unterbrochene Linie entspricht dem berechneten Verlauf mit den nach Gleichung (1) und (14) erhaltenen k_1 - und k_2 -Werten. Der mit einem Kreis markierte Punkt zeigt die FU-Konzentration am Sättigungspunkt. Die in diesem Moment zugeführte FU-Menge in mg/min ist in Tabelle 20 aufgeführt.

Der niedrigere Flow bei Patientin Z.A.(6) bewirkt, daß die Konzentration von C_{Sp} höher sein muß als bei den Patienten S.W.(4) und W.R.(5), da sich die Eliminationskapazitäten kaum unterscheiden. Bemerkenswert ist, daß aufgrund anatomischer Verhältnisse die Patientin Z.A.(6) nur über die Pfortader perfundiert werden konnte und dennoch eine vergleichbare Eliminationskapazität aufweist.



Die Berechnung von k_2 und t_2 erfolgt in mehreren Schritten. Man stelle sich vor, daß die FU-Extraktion genau in dem Augenblick beginnt, in dem die Perfusatkonzentration bei der Sättigungskonzentration C_{Sp} liegt. Dann ist $C_{02} = C_{Sp}$ ein Punkt auf der Ordinate eines Koordinatensystems, das wie in Abbildung 33 um einen Winkel $(90^\circ - \alpha)$ gedreht ist. Deshalb ergibt die Differenz von $t - t_1$ nicht den richtigen Wert für t_2 . Die Abbildung 34 zeigt einen vergrößerten Ausschnitt des Koordinatensystems von Phase 2. Der Winkel α ist die Steigung der Extraktionsgeraden von Phase 1. Es gilt

$$\tan \alpha = k_1 \quad (9)$$

Die Sinusfunktion des Winkels wird formuliert mit

$$\sin \alpha = \frac{t_2}{t - t_1} \quad (10)$$

$$\text{oder} \quad t_2 = \sin \alpha (t - t_1) \quad (11)$$

$$\text{mit} \quad t_1 = \frac{C_{01} - C}{k_1} \quad (12)$$

Gleichung (11) in Gleichung (3) eingesetzt ergibt

$$C = C_{02} \cdot e^{-k_2 \cdot \sin \alpha \cdot (t - t_1)} \quad (13)$$

Abbildung 33: Extraktionskurven der Patienten S.W.(4), W.R.(5) und Z.A.(6). Die gemessenen 5-FU-Konzentrationen sind mit durchgezogenen Linien verbunden, der berechnete Kurvenverlauf ist als unterbrochene Linie dargestellt.

oder für

$$k_2 = \frac{\ln \frac{C_{02}}{C}}{\sin \alpha (t - t_1)} \quad (14)$$

Bei bekanntem k_2 ist $T_{1/2}$ der Phase 2 mit Gleichung (4) zu bestimmen (Tab. 21). Sie beträgt für die Patienten S.W.(4) 1,3 min, für W.R.(5) 2,8 min und für Z.A.(6) 4,3 min (s.a. Abb. 33).

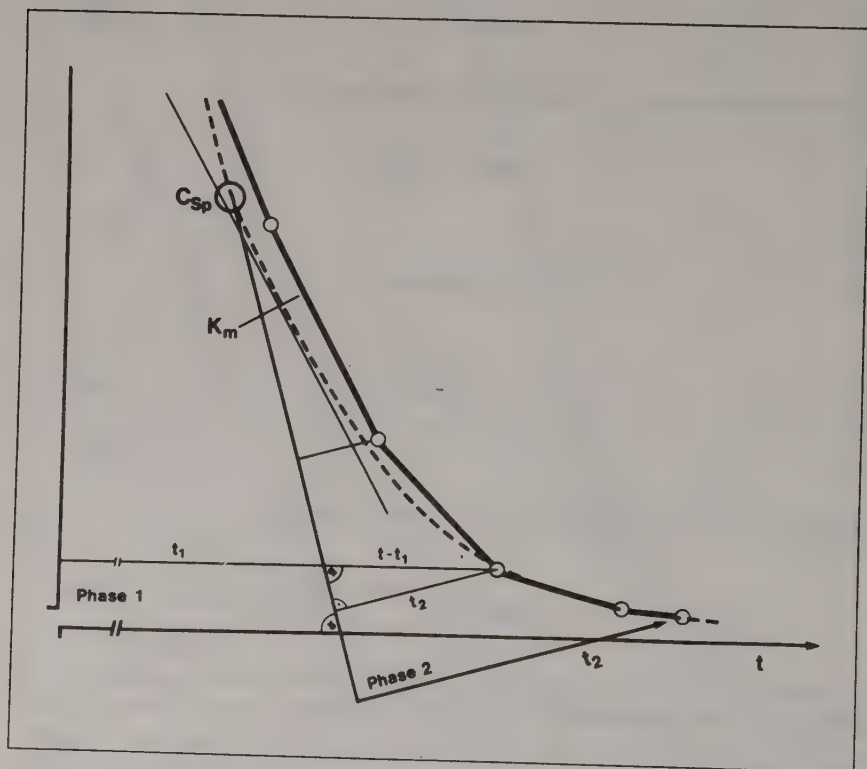


Abbildung 34: Wichtige Größen für die Berechnung von t_2 .

Patient		k_2	$T_{1/2}$	K_m	K_m	K_m	E_k
		$\frac{\mu\text{mol}}{\text{l} \cdot \text{min}}$	min	$\frac{\mu\text{mol}}{\text{l}}$	$\frac{\mu\text{mol}}{\text{min}}$	$\frac{\text{mg}}{\text{min}}$	$\frac{\text{mg}}{\text{min}}$
S.W.	4	0,52	1,3	85	34	4,4	12,7
W.R.	5	0,25	2,8	154	83,2	10,8	13,5
Z.A.	6	0,16	4,3	323	74,3	9,7	13,1

k_2	Extraktionskonstante
$T_{1/2}$	Halbwertszeit
K_m	Michaelis-Menten-Konstante (bei dieser 5-FU-Perfusatkonzentration ($\mu\text{mol/l}$) bzw. dem tatsächlichen 5-FU-Angebot pro Minute ($\mu\text{mol/min}$ od. mg/min) ist die Extraktionsgeschwindigkeit halbmaximal)
E_k	Eliminationskapazität

Tabelle 21: Pharmakokinetische Daten der Phase-2-Extraktion.

Auch wenn sich die Eliminationskapazitäten bei den Patienten S.W.(4), W.R.(5) und Z.A.(6) in der mengenmäßig wichtigen Phase 1 nicht unterscheiden, ist aus dem Phase-2-Verlauf doch eine differenziertere Beurteilung des Extraktionssystems möglich (Tab. 21). Der Wert k_2 ist als Konstante proportional zur Reaktionsgeschwindigkeit der 5-FU-Umsetzung. Beispielsweise setzt Patient S.W.(4) in Phase 2 mit einem k_2 -Wert von 0,52 mehr 5-FU um als Patientin Z.A.(6) mit einem k_2 -Wert von 0,16. Das heißt, das Extraktionssystem von Patient S.W. muß 5-FU stärker an sich ziehen

und ist deshalb besser mit Substrat versorgt. Folglich ist die Reaktionsgeschwindigkeit auch höher.

Ein Maß für die Affinität eines eliminierenden Systems zu seinem Substrat ist die Michaelis-Menten-Konstante K_m . Für sehr viele Enzyme liegt sie im Bereich von 10^{-5} bis 10^{-3} mol/l. Je kleiner K_m , desto größer ist die Affinität. Der K_m -Wert gibt diejenige Substratkonzentration an, bei der die Reaktionsgeschwindigkeit gleich der Hälfte der Maximalgeschwindigkeit V_{max} ist.

Zur Bestimmung von K_m wird eine Tangente mit der Steigung $k_1/2$ an die Kurve gelegt (Abb. 34). Im Berührungspunkt ist definitionsgemäß die Steigung von Kurve und Tangente identisch. Aufgrund der geringen Kurvenkrümmung läßt sich der zugehörige Konzentrationswert aber nur ungenau ablesen.

Eine exaktere Bestimmung ist mit der doppeltreziproken Auftragung von Reaktionsgeschwindigkeit und Substratkonzentration nach LINEWEAVER und BURK möglich (Abb. 35). K_m läßt sich dann aus dem negativen Schnittpunkt der Geraden mit der Abszisse berechnen. Die tatsächlich im Zeitpunkt von K_m umgesetzte Menge 5-FU ergibt sich wieder aus dem Produkt von Konzentration und Flow. Nun ist offensichtlich, daß die Patienten W.R.(5) und Z.A.(6) vergleichbare K_m -Werte haben, während Patient S.W.(4) deutlich darunter liegt. Das Extraktionssystem dieses Patienten hat also tatsächlich eine größere Affinität zu 5-FU (Tab. 21).

Ein weiterer Hinweis für die Wichtigkeit eines ausreichenden FU-Angebots ergibt sich aus dem Vergleich der Eliminationskapazität mit dem K_m -Wert. Bereits eine geringe Unterschreitung des Sättigungspunktes C_{Sp} bedeutet bei den Patienten W.R.(5) und Z.A.(6) eine auf die Hälfte verminderte FU-Extraktionsgeschwindigkeit (Tab. 21).

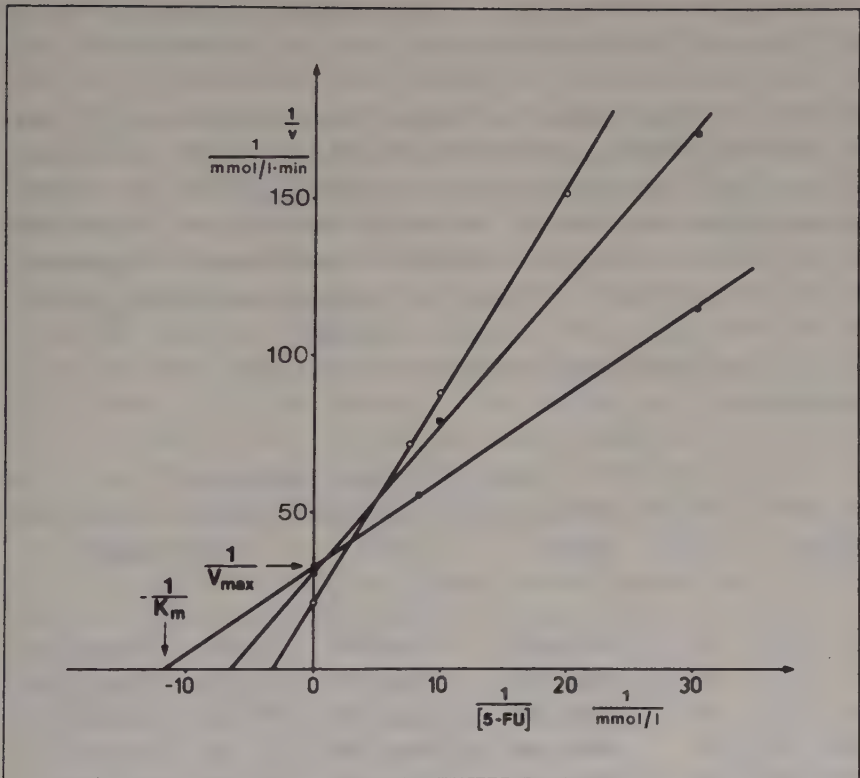


Abbildung 35: Reaktionsgeschwindigkeit und Substratkonzentration in doppeltreziproker Auftragung nach LINEWEAVER und BURK. Daten der Patienten S.W.(4) , W.R.(5) und Z.A.(6) , bei denen die Elimination nach erster Ordnung zu beobachten war.

Die Anfangskonzentration C_0 entspricht 100% der verwendeten 750 mg 5-FU. Aus den Perfusatkonzentrationen nach 30 und 60 Minuten und bei Perfusionsende lassen sich die bis dahin extrahierten Fraktionen berechnen (Tab. 22). Nach 30 Minuten sind 33 - 62% des FU aus dem Perfusat entfernt, nach 60 Minuten 68-97% und bei Perfusionsende 80-99,9%. Die durchschnittlich extrahierte Menge Fluorouracil ist bei Hyperthermie nach 30 Minuten um 11% und nach 60 Minuten um 12% höher. Am Ende der Perfusion ist der Unterschied geringer, da sich in der terminalen Phase die Extraktionsgeschwindigkeit bei den Patienten S.W., W.R. und Z.A. verringerte, während die nach wie vor gesättigten Systeme der anderen Patienten noch mit $V_{\max}$ extrahierten.

Patient			H/N	30 min	60 min	Perfusionsende
S.W.	4	H		427mg=57%	724mg=97%	70 min: 749mg=99,9%
W.R.	5	H		464mg=62%	707mg=94%	80 min: 749mg=99,9%
Z.A.	6	H		436mg=58%	647mg=86%	85 min: 749mg=99,9%
Z.R.	7	H		305mg=41%	540mg=72%	73 min: 651mg=87%
Z.Al.	8	H		337mg=45%	598mg=80%	60 min: 598mg=80%
W.F.	9	N		329mg=44%	595mg=79%	70 min: 637mg=85%
H.A.	10	N		376mg=50%	-	49 min: 608mg=81%
W.E.	11	N		251mg=33%	510mg=68%	86 min: 715mg=95%
Hyperthermie				53%	86%	93%
Normothermie				42%	74%	87%

Tabelle 22: Extraktion von 750 mg 5-Fluorouracil aus dem Perfusat.

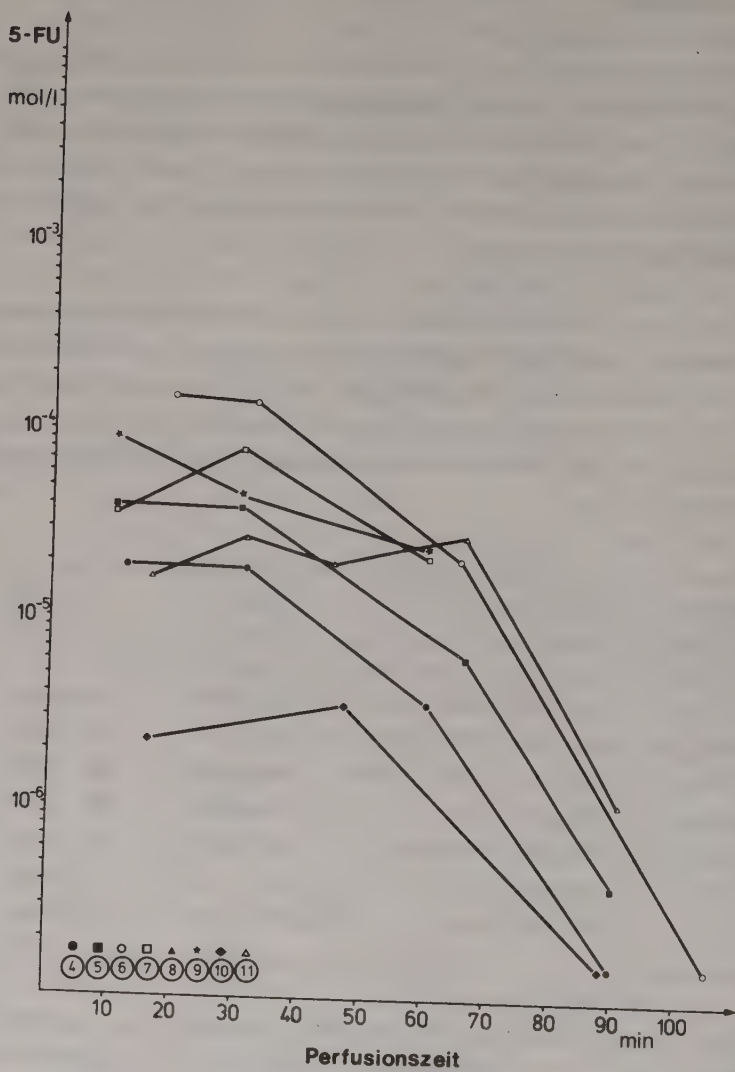
4.3.3. Systemische 5-Fluorouracil - Konzentration während der Perfusion

Das Konzentrationsgefälle vom Perfusat zum systemischen 5-FU-Spiegel ist ein Maß für die Effektivität der Leberisolation (Abb. 29 und 36). In der Regel sind die systemischen Spiegel mindestens um den Faktor 10 niedriger (Tab. 23). Leider läßt sich aus dem Vergleich der Konzentrationen nur näherungsweise das Ausmaß einer Leckage ableiten.

Wenn man das Blutvolumen als primären systemischen Verteilungsraum ansieht, liegt der Verlust an 5-FU aus dem Perfusionskreislauf bei 1-12 Prozent. Eine Vergrößerung des Blutvolumens, beziehungsweise eine Verdünnung durch Volumenzufuhr um 30% ging in die Berechnung mit ein (Tab. 24). Wir konnten nie so hohe systemische

Patient	10 min	30 min	60 min.
S.W. 4	19 μM = 1,2%	18 μM = 2,1%	3,6 μM = 5,4%
W.R. 5	40 μM = 2,6%	38 μM = 5,0%	6,3 μM = 5,5%
Z.A. 6	152 μM = 7,6%	140 μM = 12,3%	21 μM = 11,6%
Z.R. 7	36 μM = 2,9%	79 μM = 10,0%	21 μM = 5,6%
W.F. 9	91 μM = 8,2%	42 μM = 6,2%	24 μM = 8,9%
H.A. 10	2,3 μM = 0,2%	-	3,6 μM = 0,8%
W.E. 11	16,5 μM = 0,9%	26,9 μM = 1,9%	27,9 μM = 4,2%

Tabelle 23: Systemische 5-Fluorouracil-Konzentration während der Perfusion und das prozentuale Verhältnis zum gleichzeitigen Perfusatspiegel.



Patient		Blutvolumen	5-FU systemisch			Leck
			Konzentration		Absolut	
			$\mu\text{mol/l}$	$\mu\text{g/ml}$	mg	
S.W.	4	6,67	19	2,4	16,5	2,2%
W.R.	5	6,88	40	5,2	35,8	4,8%
Z.A.	6	4,68	152	19,8	92,5	12,3%
Z.R.	7	4,90	79	10,3	79,2	10,6%
W.F.	9	7,71	91	11,8	91,0	12,1%
H.A.	10	7,30	3,6	0,5	3,4	0,5%
W.E.	11	4,83	27,9	3,6	17,5	2,3%

Blutvolumen = Körperoberfläche x 2,4 (Frauen) bzw. x 2,8 (Männer)

Körperoberfläche = Größe^{0,725} x Gewicht^{0,425} x 71,84 (Dubois-Formel)

Eine Vergrößerung des systemischen Verteilungsraumes um 30% durch Volumenzufuhr wurde bei der Berechnung berücksichtigt.

Tabelle 24: Leckage des isolierten Kreislaufs.

5-FU-Konzentrationen nachweisen, daß mit ernsthaften Nebenwirkungen zu rechnen gewesen wäre.

Um das Leck zu quantifizieren, führten wir bei drei Patienten Messungen mit Evans Blue durch. Dieser Diazofarbstoff bindet sehr rasch und bis zu einer bestimmten molaren Konzentration nahezu vollständig an Plasmaalbumin [43]. Er verbleibt deshalb längere

Abbildung 36: Systemische 5-Fluorouracil-Konzentration während der Perfusion.

Zeit im Intravasalraum, dessen Volumen auf diese Weise über die Extinktionsdifferenzen bestimmt werden kann. Für die Patienten H.A.(10) und W.E.(11) ergaben sich mit Berücksichtigung des Hämatokrits Perfusatvolumina von 4,6 und 2,3 Litern. Das entspricht in etwa dem für 5-FU gefundenen Verteilungsraum (Tab. 20: 4,3 bzw. 2,7 Liter).

Evans Blue wurde bei Beginn der Perfusion zusammen mit den Zytostatika in das Perfusat gegeben. Nach der Durchmischungsphase bleiben die Extinktionswerte der in zweiminütigem Abstand entnommenen Proben bis zu zehn Minuten relativ konstant. An den 30-, 45- und 60-Minuten-Werten ist jedoch eine kontinuierliche Abnahme zu erkennen. Gleichzeitig lassen sich systemisch zunehmende Extinktionen messen. Diese noch nicht abgeschlossenen Untersuchungen deuten darauf hin, daß eine geringgradige Verbindung zwischen isoliertem und systemischem Kreislauf besteht, da ein einseitiger Verlust nur Volumen- aber keine Konzentrationsänderung bewirkt.

5-Fluorouracil wird auch bei noch isolierter Leber aus dem Systemkreislauf entfernt (Abb. 36). Bereits am Ende der Perfusion ließ sich bei vier Patienten kein FU mehr nachweisen, bei zwei Patienten enthielten die Proben 60 bzw. 100 Minuten nach Perfusionsende ebenfalls kein 5-FU mehr.

4.3.4. CEA - Konzentration im Perfusat

Während der gesamten Perfusionsdauer ändern sich die CEA-Spiegel im Perfusat nur geringfügig. Die vier Patienten S.W.(4), Z.A.(6), Z.Al.(8) und H.A.(10) zeigen nahezu gleichbleibende Spiegel, bei den Patienten W.R.(5), Z.R.(7), W.F.(9) und W.E.(11) kann man bis zum Perfusionsende eine fallende Tendenz beobachten. Diese Patien-

ten haben durchwegs auch höhere Ausgangs-CEA-Spiegel (Tab. 25, Abb.37).

Vergleicht man die bei Perfusionsbeginn simultan aus dem Perfusat (-2P) und systemisch (-5S) abgenommenen CEA-Konzentrationen, ergeben sich keine deutlichen Unterschiede. Meistens sind die

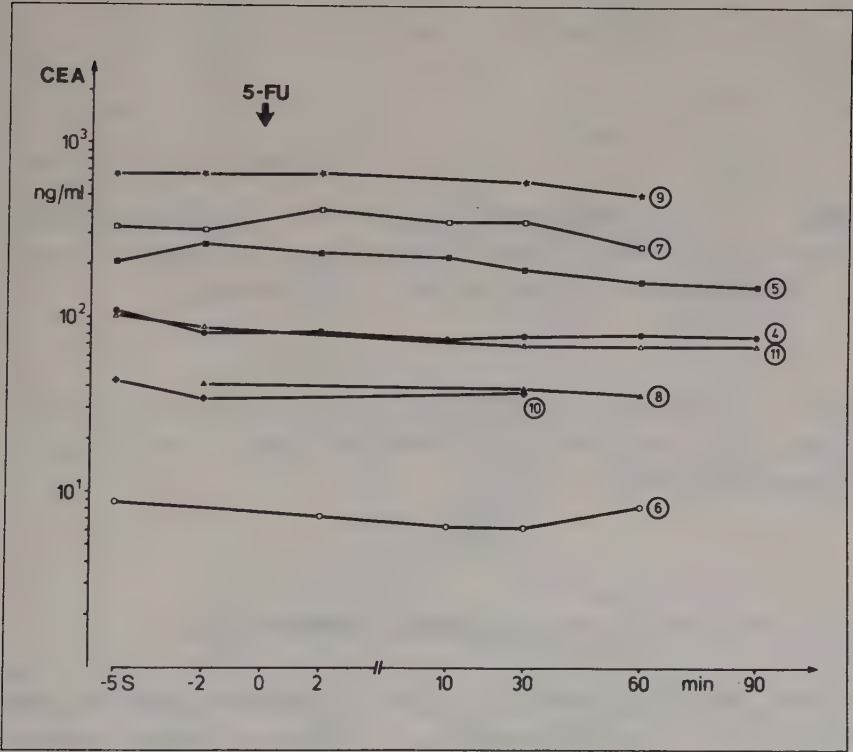


Abbildung 37: CEA-Konzentration im Perfusat. "-5S" ist der systemische CEA-Spiegel bei Perfusionsbeginn.

			5-FU						
			↓						
Patient		-5'S	-2'P	0'	2'P	10'P	30'P	60'P	90'P
S.W.	4	109	80		82	75	79	81	79
W.R.	5	208	265		239	227	192	161	156
Z.A.	6	8,7	-		7,2	6,3	6,2	8,2	-
Z.R.	7	329	319		422	360	359	261	-
Z.Al.	8	-	41		-	-	39	36	-
W.F.	9	671	680		686	-	611	520	-
H.A.	10	42	34		-	-	39	-	-
W.E.	11	107	89		-	-	70	69	70

Tabelle 25: CEA-Konzentration (ng/ml) im isolierten Kreislauf während der Perfusion. Systemische CEA-Spiegel (S), Perfusat-Spiegel (P), ' = Abnahmezeit in Minuten, bei 0' 5-FU-Zugabe.

Spiegel im Perfusat etwas niedriger, da das Blut der Maschinenfüllung beim Start des isolierten Kreislaufs natürlich einen verdünnenden Effekt hat.

4.3.5. CEA - Intra- und postoperativer Kurzzeitverlauf

Bis zum Beginn der Perfusion ist die CEA-Konzentration bei fast allen Patienten im Vergleich zum präoperativen Spiegel deutlich abgefallen. Das präoperative CEA wurde einen oder wenige Tage vor der ILP bestimmt. Vermutlich wird es vor allem durch anästhesiologische Maßnahmen während der Operation, namentlich Volumen-

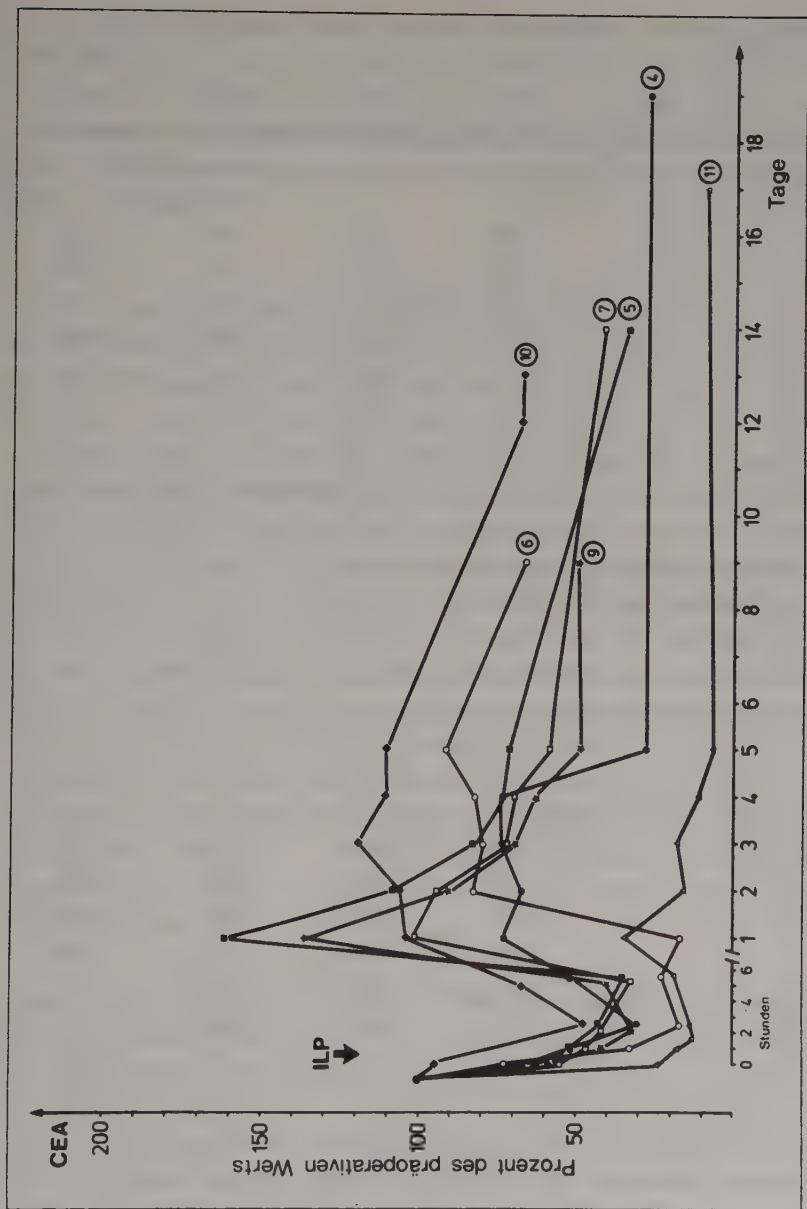


Abbildung 38: CEA - Intra- und postoperativer Kurzzeitverlauf. Der präoperative Wert ist 100%.

Patient		A	B	C	D	E
		CEA	CEA	CEA	CEA	CEA
		vor OP	vor Perf.	Min.Op	Max.p.op.	Min.KZV
S.W.	4	174	109	54	128	48
W.R.	5	311	208	109	505	105
Z.A.	6	12	8,7	2	10	8
Z.R.	7	598	329	198	608	253
W.F.	9	1134	671	361	1548	556
H.A.	10	44	42	21	53	30
W.E.	11	437	107	55	151	40

A CEA präoperativ

B CEA intraoperativ vor Perfusionsbeginn

C CEA Minimum am Operationstag

D CEA Maximum in der frühen postoperativen Phase

E CEA Minimum im postoperativen Kurzzeitverlauf

		$\frac{B}{A} 100$	$\frac{C}{A} 100$	$\frac{D}{A} 100$	$\frac{E}{A} 100$
S.W.	4	63%	31%	74%	28%
W.R.	5	67%	35%	162%	34%
Z.A.	6	73%	17%	83%	67%
Z.R.	7	55%	33%	102%	42%
W.F.	9	59%	32%	137%	49%
H.A.	10	95%	48%	120%	68%
W.E.	11	24%	13%	35%	9%

Tabelle 26: CEA-Kurzzeitverlauf. Meßwerte (ng/ml) oben und prozentuales Verhältnis zum präoperativen CEA-Spiegel unten.

zufuhr, auf 24-73% verdünnt. Bei der Patientin W.E.(11) sinkt es auf 24% des am Operationstag präoperativ abgenommenen CEA-Spiegels. Der Patient H.A.(10) zeigt keine derartige CEA-Reduzierung bis zum Perfusionsbeginn. In welchem Ausmaß ein CEA-Katabolismus oder Proteinverschiebungen ursächlich eine Rolle spielen können, ist noch nicht geklärt.

Im Verlauf des OP-Tages sinkt die systemische CEA-Konzentration auf 17-35% weiter ab. Auch beim Patient H.A.(10) läßt sich nur noch die Hälfte (48%) des präoperativen Wertes nachweisen (Tab. 26). Von diesem Minimalwert am Op-Tag (2-361 ng/ml) steigt das CEA innerhalb eines Tages auf das zweieinhalb- bis fünffache an (10-1548 ng/ml). In vier von sieben Fällen liegt das CEA wieder bei oder über dem präoperativen Wert. Patient W.R.(5) und Patient W.F.(9) überschreiten um 62% beziehungsweise 37% die Ausgangskonzentration (Abb. 38). Die Verdopplungszeit für diesen Anstieg ist 0,4 bis 0,9 Tage, mit einem Median von 0,5 Tagen (Tab. 27).

In den folgenden zwei Tagen fällt das CEA mit Halbwertszeiten von 0,7 bis 4,2 Tagen ab ($\bar{x}$ = 2,1 Tage). Die Patienten S.W.(4), Z.A.(6) und H.A.(10) bilden zunächst ein Plateau über drei Tage, der Patient S.W. fällt dann schnell ab (HWZ = 0,7 Tage) und die Patienten Z.A. und H.A. langsamer mit Halbwertszeiten von 23 und 9,2 Tagen. Bei den Patienten mit sofortigem und schnellem CEA-Abfall schließt sich eine Phase mit längerer Halbwertszeit (8,5-14,5 Tage) an.

9 bis 19 Tage nach der isolierten Leberperfusion sind die CEA-Werte aller Patienten unter dem präoperativen Wert und zwar um 33% bis 91% erniedrigt (8-556 ng/ml).

Patient	CEA-VDZ		CEA-HWZ
	Op-1.Tag	1.-3.Tag	3.-14.Tag
S.W. 4	0,7	0,7	13,0
W.R. 5	0,4	2,1	8,5
Z.A. 6	0,4	-	23,0
Z.R. 7	0,5	4,2	14,5
W.F. 9	0,4	2,1	13,6
H.A. 10	0,9	-	9,2
W.E. 11	0,9	1,9	14,8
$\bar{x}$	0,5	2,1	13,6

Tabelle 27: Verdopplungszeiten (VDZ) und Halbwertszeiten (HWZ) des CEA im postoperativen Kurzzeitverlauf (in Tagen).

4.3.6. CEA - Langzeitverlauf

Die Kontrolle des CEA-Werts spielt bei der Nachsorge kolorektaler Karzinome eine große Rolle. Ein Wiederanstieg ist ein wichtiger Hinweis für ein Lokalrezidiv oder das Auftreten von Fernmetastasen.

Auch bei unseren Patienten war der CEA-Verlauf ein Kriterium für die Entscheidung zur ILP. Bei allen genügend erfaßten Patienten ist das CEA vor der ILP angestiegen. Die kürzeste Verdopplungszeit betrug 25,5 Tage, die längste 161 Tage (Tab. 28). Fünf von acht Patienten hatten eine Verdopplungszeit von 25-30 Tagen, mit einem Median von 28,4 Tagen. Wenn sich die Verdopplungszeit beziehungs-

		ILP					
Patient		CEA↑ VDZ	CEA↓ HWZ	Intervall Tage*	CEA↑ VDZ	CEA const.	CEA↓ HWZ
N.G.	1	27,3	6,7	143	53,3	-	-
S.O.	2	28,8	19,4	164	43,0	-	-
D.M.	3	48,9	18,3	<	-	10**	-
S.W.	4	Ø	3,3	109	64,2	-	-
W.R.	5	Ø	5,7	<	-	-	-
Z.A.	6	27,4	21,1	185	45,3	-	-
Z.R.	7	28,0	16,6	70	23,6	-	-
Z.A.I.	8	Ø	4,7	<	-	-	49,9
W.F.	9	25,5	17,0	<	-	100**	-
H.A.	10	55,1		<			
W.E.	11	160,9		<			
$\bar{x}$		28,4	16,6		45,3		

Ø Kein präoperativer Verlauf bekannt.

* Intervall bis CEA wieder den ILP-Ausgangswert erreicht.

< CEA ist im Beobachtungszeitraum (21, 15, 12, 10, 4, 1 Monate) nicht wieder bis zum Ausgangswert angestiegen.

** Die berechnete HWZ/VWZ ist größer als 200 Tage. Die Zahlenangaben geben den aktuellen CEA-Spiegel (ng/ml) an.

Tabelle 28: Verdopplungszeiten (VDZ) und Halbwertszeiten (HWZ) des CEA im Langzeitverlauf vor und nach der isolierten Leberperfusion (in Tagen).

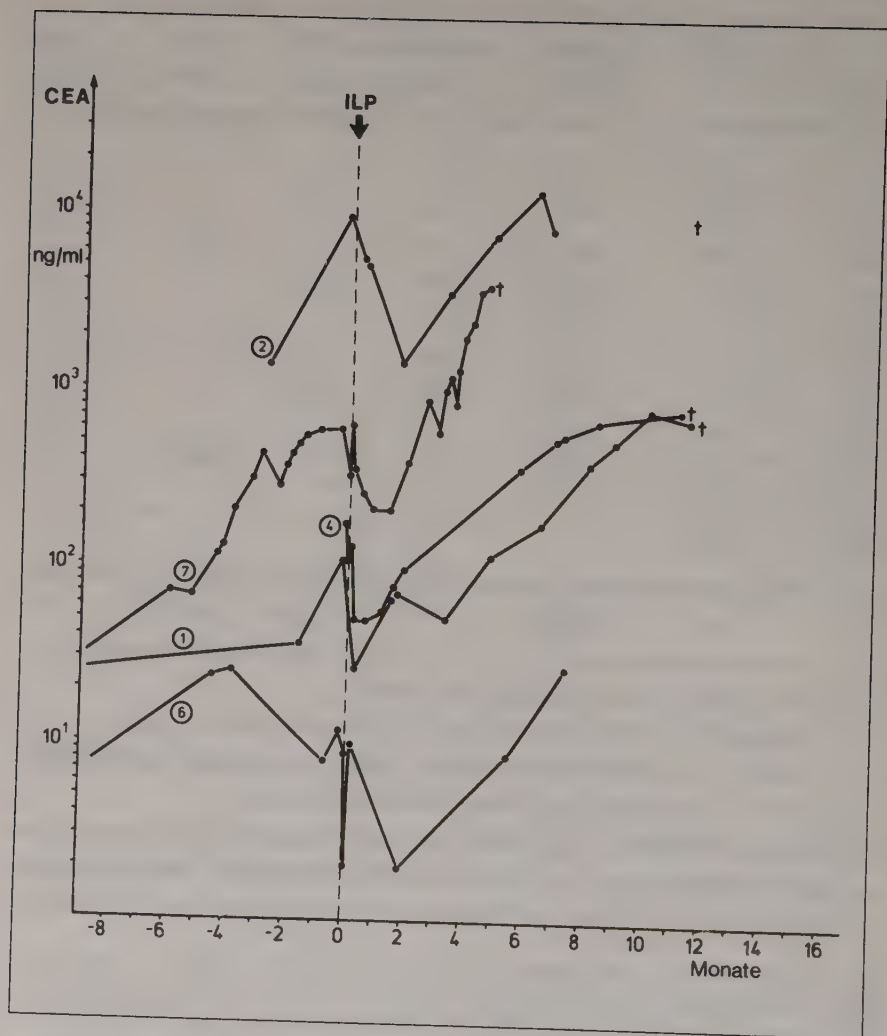


Abbildung 39: CEA-Langzeitverlauf der Patienten N.G.(1), S.O.(2), S.W.(4), Z.A.(6) und Z.R.(7). Die vier Patienten mit den höchsten CEA-Werten sind verstorben.

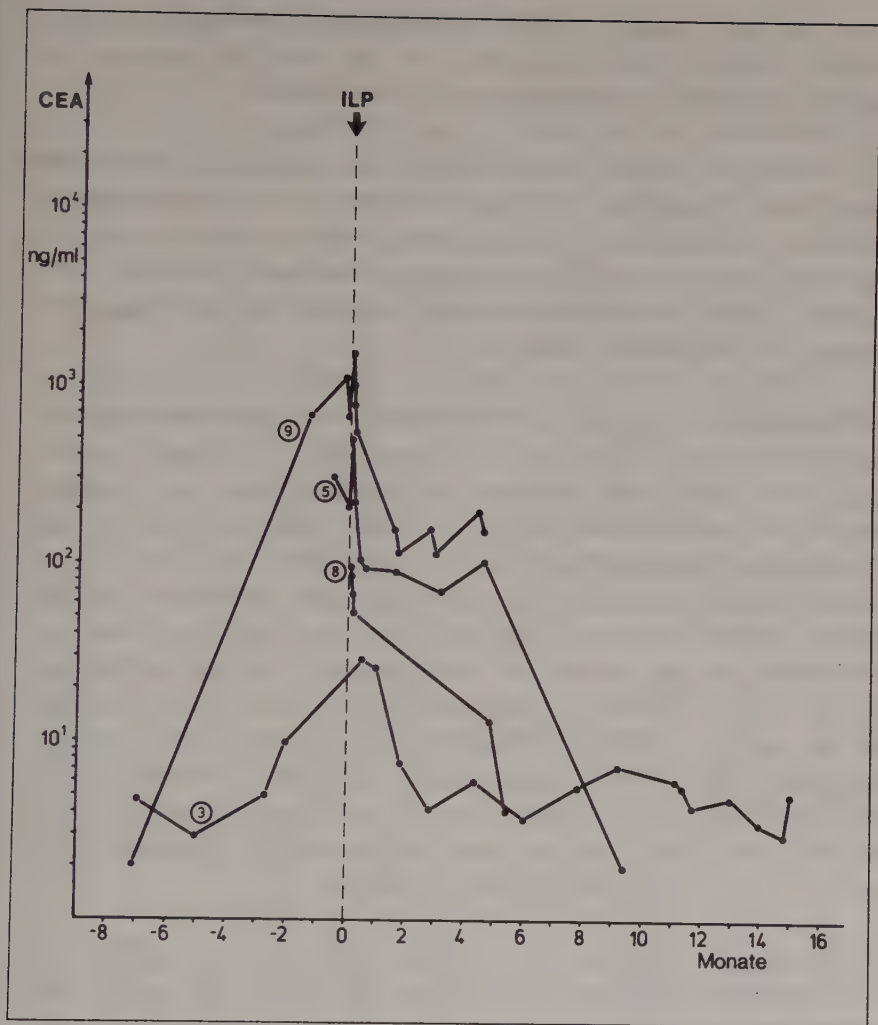


Abbildung 40: CEA-Langzeitverlauf der Patienten D.M.(3), W.R.(5), Z.Al.(8) und W.F.(9).

weise die Halbwertszeit nicht eindeutig aus zwei repräsentativen Werten errechnen ließ, bestimmten wir sie über die Steigung der Regressionsgeraden im entsprechenden Zeitabschnitt.

Die CEA-Konzentrationen zum Zeitpunkt der ILP lagen bei 12-9383 ng/ml (Abb. 39 und 40). Wie bereits erwähnt, hatten alle Patienten isolierte Lebermetastasen. Nachgewiesene extrahepatische Manifestation wäre auch eine Kontraindikation der isolierten Leberperfusion. So zeigt auch die CEA-Konzentration unserer Patienten die weite Streuung der möglichen Befunde.

Im postoperativen Kurzzeitverlauf konnten wir bereits einen erniedrigten CEA-Spiegel nach der ILP feststellen. Im Langzeitverlauf zeigt sich, daß diese Abnahme mit Halbwertszeiten von 3,3-21,1 Tagen bei den Patienten N.G.(1), S.O.(2), S.W.(4), Z.A.(6) und Z.R.(7) nur vorübergehend ist (Tab. 27, Abb. 39). Nach einem wenige Wochen dauernden Intervall steigt das CEA erneut an und erreicht 70-185 Tage nach der ILP die gleiche Konzentration wie unmittelbar vor der Perfusion. Auffallend ist eine auf 43-53 Tage ($\bar{x}$ = 45 Tage) verlängerte Verdopplungszeit nach der Perfusion. Nur bei der Patientin Z.R.(7) ist das CEA nach der ILP gering schneller angestiegen als vorher. Diese Patientin verstarb fünf Monate nach der ILP (CEA präfinal 3799 ng/ml). Die Patienten S.O.(2) und S.W.(4) sind knapp ein Jahr nach der Perfusion verstorben (beim Patient S.W. war das CEA präfinal 759 ng/ml).

Die CEA-Spiegel der Patienten D.M.(3), W.R.(5) und Z.A1.(8) sind auf niedrig pathologische Werte unter 10 ng/ml abgefallen. Der Patient W.F.(9) hat nach wie vor pathologisch erhöhtes CEA, aber einen niedrigeren Spiegel als vor der ILP (Abb. 40). Bei den Patienten H.A.(10) und W.E.(11) ist der Beobachtungszeitraum nach der ILP zu kurz, um eine Verlaufsaussage machen zu können.

4.3.7. Verlauf der Ammoniakkonzentration

Da die Leber für die Dauer der Perfusion funktionell aus dem Körperkreislauf ausgeklemmt ist, belastet das im Mesentericagebiet entstehende Ammoniak den Gesamtorganismus. Wir konnten bei vier Patienten die systemische Ammoniakzunahme bestimmen (Tab. 29).

Die Anfangskonzentration lag mit 24-57 $\mu\text{g}/100\text{ml}$ Plasma im Normbereich (20-80 $\mu\text{g}/100\text{ml}$). Noch während der Perfusion stieg sie auf das 1,2 bis 2,7fache an. Trotzdem lag nur einer der vier Patienten mit 142 $\mu\text{g}/100\text{ml}$ deutlich über dem Normbereich. In der Vena mesenterica fanden wir Ammoniakspiegel von 239-474 $\mu\text{g}/100\text{ml}$.

Patient	ILP-Verlauf		Postoperativer Verlauf					
	syst.		V.mes.					
N.G. 1	-	-	-	d2/38	d3/36	-	-	-
S.O. 2	-	-	-	d1/118	-	-	-	d15/88
W.R. 5	-	-	-	-	-	d7/44	-	-
Z.A. 6	-	-	-	-	d2/90	d5/45	d8/30	-
Z.R. 7	24 - 51	277	-	-	-	-	-	-
Z.Al. 8	57 - 142	474	d1/30	d2/60	-	-	-	-
W.F. 9	38 - 102	284 - 238	d1/54	d2/41	-	-	-	-
H.A. 10	-	-	-	d2/76	d4/67	d8/100	-	-
W.E. 11	54 - 66	239 - 303	d1/82	d2/46	d3/66	d4/68	-	-

Tabelle 29: Ammoniakkonzentration ($\mu\text{g}/100\text{ml}$) während der isolierten Leberperfusion systemisch und in der Vena mesenterica und im postoperativen Verlauf.

In den postoperativen Tagen lagen die Werte bei allen Patienten im Normbereich. Lediglich der Patient S.O.(2) hatte am ersten postoperativen Tag noch einen erhöhten Blutammoniakspiegel (118 $\mu\text{g}/100\text{ml}$). Die Erhöhung der systemischen Ammoniakkonzentration ist also nur kurzfristig und nicht sehr ausgeprägt, sodaß auf eine portokavale Hämofiltration während der Perfusion verzichtet werden kann.

4.3.8. Überlebenszeiten

Die Operation des Primärtumors erfolgte 2-35 Monate vor der isolierten Leberperfusion (Tab. 30, Abb. 41). Zu diesem Zeitpunkt hatte das Karzinom bereits in 5 Fällen in die Leber metastasiert. Bei 6 Patienten ließen sich Leberfiliae erst 1, 6, 10, 20, 27 und 28 Monate nach der Operation diagnostizieren. Bis zur ILP vergingen dann noch 1-15 Monate.

Die mittlere und die mediane Überlebenszeit unserer Patienten nach der ILP beträgt derzeit (30.11.1985) 11,5 Monate. Eine Lebermetastasierung besteht im Durchschnitt seit 18 Monaten. Vier Patienten sind 5,5, 11,5, 11,5 und 18 Monate nach der ILP verstorben. Die Lebermetastasierung ist bei diesen Patienten 13,5, 15,5, 16,5 und 33 Monate vor ihrem Tod aufgetreten. Eine Patientin verstarb sechs Wochen nach der ILP an einer Lungenembolie.

Krankheitsverlauf und Überlebenszeit

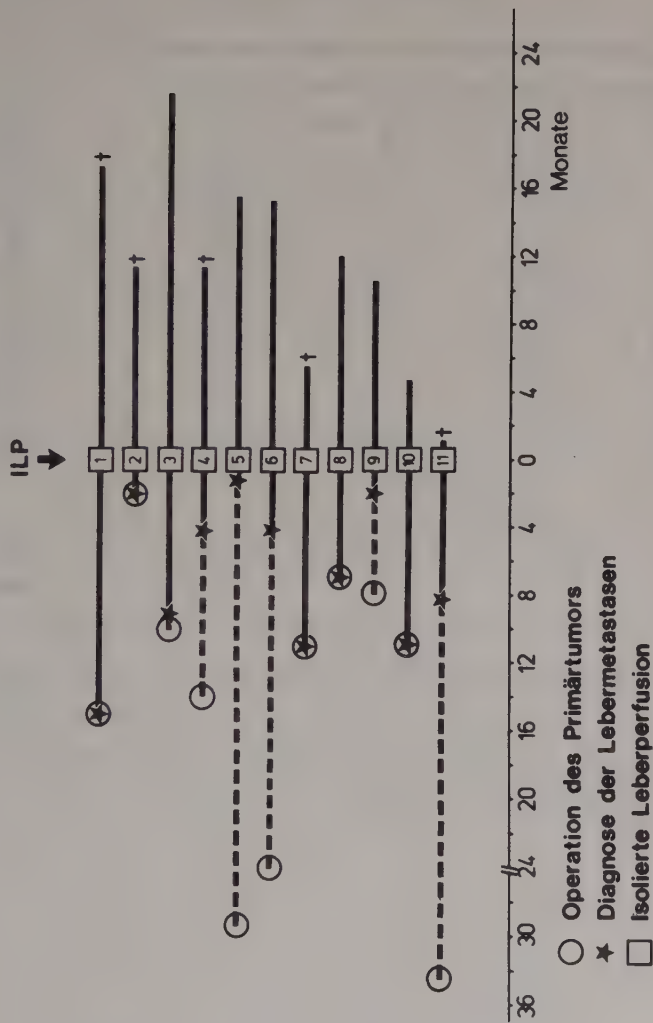


Abbildung 41: Krankheitsverlauf und Überlebenszeit der perfundierten Patienten.

Patient		Op - ILP	Dg - ILP	ÜLZ nach ILP	ÜLZ mit Leberfiliae	
N.G.	1	15	15	18	33	+
S.O.	2	2	2	11,5	13,5	+
D.M.	3	10	9	21,5	30,5	
S.W.	4	14	4	11,5	15,5	+
W.R.	5	29	1	15,5	16,5	
Z.A.	6	24	4	15	19	
Z.R.	7	11	11	5,5	16,5	+
Z.Al.	8	7	7	12	19	
W.F.	9	8	2	10,5	12,5	
H.A.	10	11	11	4,5	15,5	
W.E.	11	35	8	1,5	9,5	+
$\bar{x}$		15	6,7	11,5	18,3	
$\bar{x}$		11	8	11,5	16,5	

Tabelle 30: Krankheitsverlauf und Überlebenszeit (ÜLZ) in Monaten. Op-ILP ist die Zeit von der Operation des Primärtumors und Dg-ILP die Zeit von der Diagnose der Lebermetastasierung bis zur ILP. Die mit "+" gekennzeichneten Patienten sind verstorben.

5. DISKUSSION

5.1. Methodik des 5-Fluorouracil-Nachweises

Fast dreißig Jahre nach der ersten klinischen Anwendung ist 5-FU nach wie vor ein wichtiges Medikament bei der Behandlung von Neoplasmen, nicht nur kolorektalen Ursprungs. Heute wird 5-FU in vielen Dosierungsschemata allein oder mit einem oder mehreren anderen Chemotherapeutika kombiniert verabreicht. Obwohl es eines der am häufigsten verwendeten Zytostatika ist, konnte man lange Zeit keine für den klinischen Alltag geeignete Nachweismethode aufbauen, um die Plasma- beziehungsweise Serumspiegel zu bestimmen. Ohne pharmakokinetische Daten mußte man die beste Dosierung empirisch ermitteln und bei Auftreten von Nebenwirkungen die Therapie unterbrechen. Für 5-FU ist insbesondere mit einer Knochenmarksdepression und gastrointestinalen Nebenwirkungen zu rechnen. Der grundsätzliche Wert einer Konzentrationsbestimmung eines Zytostatikums liegt neben den pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Erkenntnissen in der Aufdeckung individueller Variationen des Metabolismus, verbunden mit einer relativen Über- oder Unterdosierung. Zu beobachten ist dann entweder eine Toxizität des Zytostatikums oder ein zu geringes oder kein Ansprechen auf die Therapie.

Inzwischen wurden viele verschiedene analytische Methoden entwickelt, um 5-FU im Plasma zu messen. Zu den ersten gehörte der von CLARKSEN et al. [12] im Jahre 1964 beschriebene mikrobiologische Assay. Dieser Test ist ausgesprochen sensitiv. Mit ihm können noch FU-Konzentrationen von 50 nmol/l nachgewiesen werden. Allerdings schwankt der Durchmesser der Hemmhöfe bei gleichen Proben bis zu 1,5 mm. Einer Variation des Durchmessers von ± 1 mm entspricht aber bereits ein Konzentrationsunterschied von etwa 25%. Außerdem sind diese Tests sehr arbeitsintensiv und für Routineuntersuchungen nicht geeignet.

In den darauffolgenden Jahren wurden einige gaschromatographische Verfahren publiziert. Für die Analyse mit der Gaschromatographie kommen jedoch nur Stoffe in Frage, die flüchtig sind oder sich bei höheren Temperaturen unzersetzt verdampfen lassen. Hier liegt auch ein Problem dieser Methode: Fluorouracil hat einen Schmelzpunkt von 280–284°C und zerfällt bereits bei 289°C [24, 44]. Deshalb müssen flüchtigere Derivate hergestellt werden. Die geschieht zum Beispiel durch die Substitution von zwei jeweils an Stickstoff gebundenen Wasserstoffatomen durch Methylgruppen. Bei einer Trennung mit der Gaschromatographie und einer Detektion und quantitativen Bestimmung mit der Massenspektrometrie sind die bislang geringsten Mengen von 5-FU nachgewiesen worden. Das von AUBERT et al. [4] beschriebene Verfahren hat eine Nachweisgrenze von $4 \cdot 10^{-8}$ mol/l. KOK und VAN GROENINGEN [29] haben in einer neueren Arbeit sogar Plasmaspiegel bis zu $3 \cdot 10^{-9}$ mol/l nachgewiesen.

Mit der Einführung der Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) in die analytische Technik Anfang der siebziger Jahre wurde ein großer Fortschritt erzielt. Das Prinzip der Flüssigchromatographie, die Verteilung eines Probengemisches zwischen zwei Phasen, wurde schon 1906 von dem russischen Botaniker Michael Tswett beschrieben. Er verwendete diese Technik zur Trennung von Pflanzenpigmenten. Sie geriet aber in Vergessenheit und wurde erst Jahrzehnte später wieder aufgegriffen und weiterentwickelt [22]. Martin und Synge zeigten 1941 mit theoretischen Überlegungen, daß eine gute Chromatographie in flüssiger Phase mit sehr kleinen gebundenen Teilchen für die stationäre Phase möglich sein müßte. Zum Durchpressen der mobilen Phase ist dementsprechend hoher Druck notwendig. HPLC ist deshalb auch die Abkürzung für High Pressure Liquid Chromatography [34].

Die Leistungsfähigkeit der HPLC erregte dann erst 30 Jahre später großes Aufsehen, als der Nobelpreisträger Woodward 1971 über die

Trennung von sich nur gering unterscheidenden Zwischenprodukten der Vitamin B₁₂-Synthese berichtete. Seither wurde die apparative Technik wesentlich verbessert, zunehmend werden für die Steuerung der Anlage und für die Auswertung der Daten Computer eingesetzt. Noch wichtiger war und ist aber die Weiterentwicklung des Herzstücks einer Chromatographie-Apparatur, der Trennsäule. Inzwischen ist eine nahezu unüberschaubare Vielzahl von Säulen mit unterschiedlichsten Eigenschaften des Packungsmaterials auf dem Markt.

Die vorliegenden Arbeiten über die Bestimmung von 5-Fluorouracil im Plasma beschränken sich auf drei unterschiedliche Trennprinzipien.

COHEN [14] und HSU [24] arbeiten mit Ionenaustauschchromatographie (Tab. 31). Bei diesen Säulen enthält die stationäre Phase ionische Gruppen, trägt also an der Oberfläche elektrische Ladungen. Die Ionen der mobilen Phase und ionische Probemoleküle konkurrieren um diese Bindungsstellen. Kationenaustauscher gehen mit positiv geladenen Kationen eine Bindung ein, während sich bei Anionenaustauschern negativ geladene Ionen anlagern. Bei den von COHEN und HSU angegebenen Bedingungen muß 5-FU also gegensätzliche Ladungen haben.

Die Untersucher verwenden als internen Standard 5-Chlorouracil beziehungsweise Chlorpheniramin. Die quantitative Analyse erfolgt über eine Bestimmung der Peakhöhen und mit Hilfe einer Eichkurve, die das Signalverhältnis von internem Standard und 5-FU in Abhängigkeit von der FU-Konzentration darstellt. Die Retentionszeiten unterscheiden sich deutlich, COHEN gibt 8 Minuten und HSU 3,6 Minuten an. Das ist nicht verwunderlich, handelt es sich doch um verschiedene Methoden, auch wenn das Trennprinzip gleich ist.

Ein wichtiges Maß für die Leistungsfähigkeit einer Trennmethode ist

	COHEN (1977)	HSU (1980)
Probe	Plasma	Plasma
Trennsäule	300mm x 2,0mm I.D.	250mm x 4,6mm I.D.
Hersteller	Bio-Rad	Whatman
Phase	Aminex A-25	Partisil SCX
Prinzip	Anionenaustauscher	Kationenaustauscher
Eluent	Azetat-Puffer 0,3M pH 4,5	(NH ₄)H ₂ PO ₄ 0,014M pH 3,5
Flow	0,7 ml/min	1,0 ml/min
Wellenlänge	254 nm	266 nm
Extraktion	Äther:n-Propanol 80:20	Isopropanol:Äthylacetat 16:84
Int. Standard	5-Chlorouracil	Chlorpheniramin
Injektion	5-25 µl	10-20 µl
Retentionszeit	5-FU 8 min Int.St. 17 min	5-FU 3,6 min Int.St. 2,2 min
Bodenzahl	5-FU 3100 Int.St. 1100	5-FU 2200 Int.St. 1300
Nachweisgrenze	1 · 10 ⁻⁶ mol/l	nicht angegeben

Tabelle 31: 5-Fluorouracil-Bestimmung nach COHEN [14] und HSU [24] mit Ionenaustauschchromatographie.

die Bodenzahl N. Sie ist nicht nur von der Güte der Säulenpackung abhängig, sondern auch von mehreren variablen Parametern. Die Zusammensetzung des Eluenten, die Fließgeschwindigkeit, die Temperatur und nicht zuletzt die Spezifität der Säule für das

aktuelle Trennproblem gehen in diese Größe mit ein. Die allgemeine Beziehung lautet

$$N = a \left(\frac{t_R}{w} \right)^2$$

wobei a eine Konstante abhängig von der Höhe der Peakbreitenmessung ist, t_R die Retentionszeit und w die Peakbreite in Minuten. Häufig sind die Peaks an der Basis etwas mehr verbreitert als es der Gaußschen Verteilung entspricht. Dieses Problem nennt man Tailing beziehungsweise Fronting. Deshalb mißt man die Peakbreite für die Bodenzahlbestimmung gerne in halber Peakhöhe. Der Faktor a beträgt dann 5,54.

Die in den Tabellen angegebenen Bodenzahlen wurden anhand der veröffentlichten Chromatogramme berechnet. Bei COHEN ist $N = 3100$ für 5-FU und $N = 1100$ für Chlorouracil. Auch bei HSU ist die Bodenzahl für den internen Standard Chlorpheniramin mit $N = 1300$ niedriger als die für 5-FU mit $N = 2200$.

Ein vollkommen anderes Chromatographieprinzip verwenden SITAR [49] und AUBERT [4]. Bei der Gelchromatographie bewirken nicht irgendwelche Wechselwirkungen die Trennung, sondern ein einfacher Klassifizierungsprozeß nach Molekülgröße. Kleine Moleküle verweilen dabei länger in den Poren der stationären Phase und werden später eluiert. In beiden Arbeiten wird als Eluent ein organisches Lösungsmittel verwendet, man spricht deshalb von Gelpermeationschromatographie (Tab. 32).

Obwohl SITAR eine längere Säule und geringere Fließgeschwindigkeit wählt, ist die Retentionszeit mit 4 Minuten kürzer als bei AUBERT. Das spricht für einen schlechteren Kontakt zwischen Probe und stationärer Phase, was auch an der kleinen Bodenzahl ($N = 90$) und

	SITAR (1977)	AUBERT (1981)
Probe	Plasma	Plasma
Trennsäule	500mm x 3mm I.D.	300mm x 3,9mm I.D.
Hersteller	nicht angegeben	Waters
Phase	Silicagel 10 µm	µPorasil 10 µm
Prinzip	Gelpermeation	Gelpermeation
Eluent	Isopropanol:Essigsäure: Chloroform 15:1:84	Hexan:Äthanol 75:25
Flow	0,66 ml/min	1,0 ml/min
Wellenlänge	272 nm	264 nm
Extraktion	Isopropanol:Chloroform 25:75	Isopropanol:Äther 25:75
Standard	extern 5-FU	intern 5-Bromouracil
Injektion	nicht angegeben	10 µl
Retentionszeit	5-FU 4 min	5-FU 7,5 min Int.St. 6,4 min
Bodenzahl	5-FU 90	5-FU 4200 Int.St. 3900
Nachweisgrenze	$1 \cdot 10^{-6}$ mol/l	$4 \cdot 10^{-7}$ mol/l

Tabelle 32: 5-Fluorouracil-Bestimmung nach SITAR [49] und AUBERT [4] mit Gelpermeationschromatographie.

der Breite des Peaks zu erkennen ist. AUBERT erreicht bei einer hohen Bodenzahl und guter Auflösung eine Nachweisgrenze von unter 10^{-6} mol/l.

Die chemische Modifikation des Silicagels (bonded phase chromatography) ermöglicht ein weites Spektrum von funktionellen Gruppen und Polaritäten an der Oberfläche der stationären Phasen. Ob aber bei einem bestimmten Trennproblem die theoretische Spezifität einer Säule wirklich gut trennt, muß leider oft genug empirisch ermittelt werden. Bei der Reversed-Phase-Chromatographie, der bedeutendsten unter den chemisch gebundenen Phasen, sind an die Silanolgruppen des Silicagels apolare Gruppen gebunden.

MACMILLAN [33] und SAMPSON [45] verwenden die μ Bondapak C18 Säule von Waters mit Octadecyl als funktioneller Gruppe (Tab. 33). Das Packungsmaterial ist irregulär und hat eine Korngröße von 10 μ m. Die von uns angegebene Säule der Firma Shandon ist ebenfalls mit Octadecylsilan gefüllt, allerdings von runder Form und 5 μ m Korngröße. Beide Untersucher eluieren mit Phosphatpuffer. MACMILLAN muß jedoch nach 11 Minuten (RT von 5-FU = 7 min) einen Methanolanteil von 8% zugeben, um den internen Standard Thymidin von der Säule zu bekommen (RT = 22 min). Bei SAMPSON hat der interne Standard 5-Bromouracil eine Retentionszeit von 12 Minuten. Die Bodenzahl N ist bei ihm 2400 für 5-FU und 4900 für 5-BU, bei MACMILLAN 300 für 5-FU und 1700 für Thymidin.

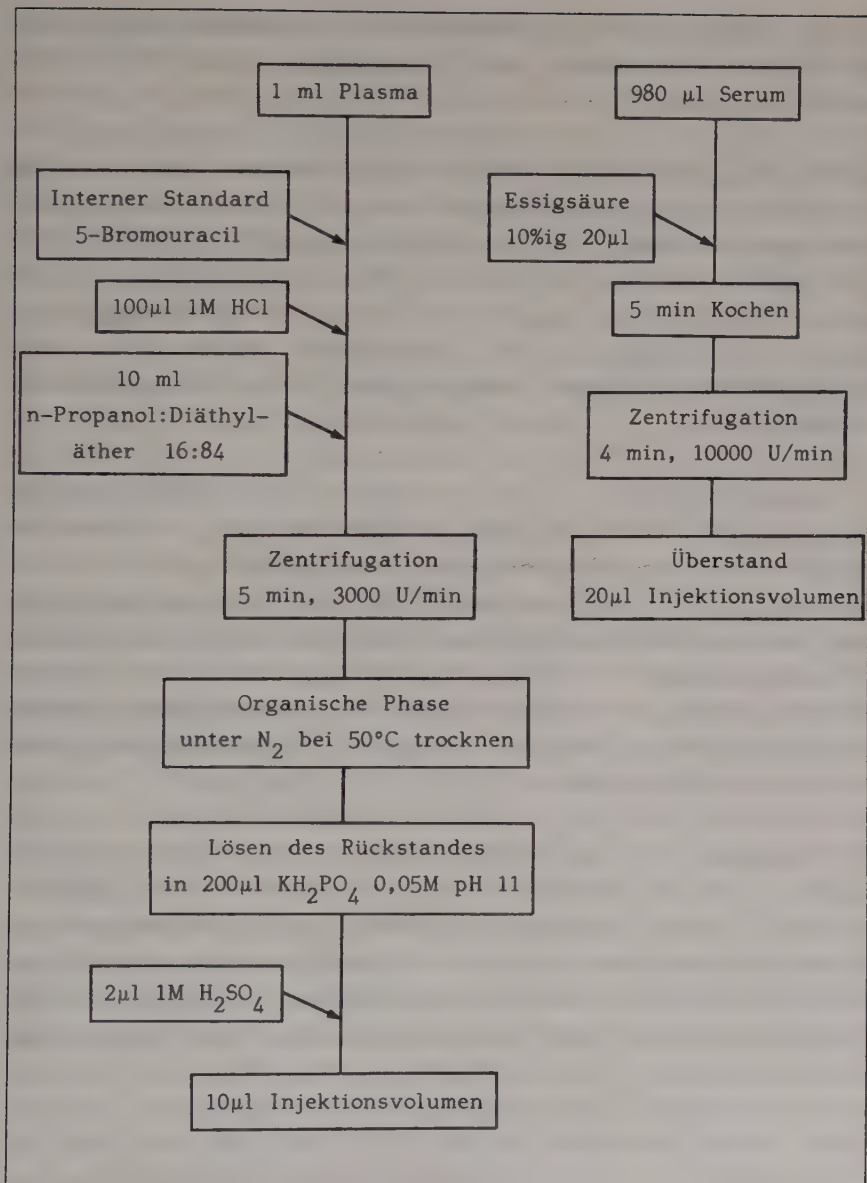
Bei unseren chromatographischen Bedingungen erreicht man eine Retentionszeit von 4,9 bis 5,4 Minuten (je nach Säulencharge) bei einer Bodenzahl von 3000. Unser Verfahren unterscheidet sich in drei wesentlichen Punkten von allen angegebenen Methoden.

1. Unsere Proben werden aus Serum aufbereitet. Es sind keine gerinnungshemmenden Maßnahmen erforderlich. Vergleichende Messungen von Plasma- und Serumproben ergaben keinen Unterschied der 5-FU-Konzentration. Eine Proteinbindung von 5-FU wird auch in der Literatur nicht angegeben [32].

	MACMILLAN (1978)	SAMPSON (1982)
Probe	Plasma	Plasma
Trennsäule	300mm x 4mm I.D.	nicht angegeben
Hersteller	Waters	Waters
Phase	μ Bondapak C18	μ Bondapak C18
Prinzip	Reversed Phase	Reversed Phase
Eluent	Phosphatpuffer 0,02M pH 5,5	KH_2PO_4 0,05M pH 3
Flow	1,2 ml/min	0,8–1,0 ml/min
Wellenlänge	nicht angegeben	266 nm
Extraktion	n-Propanol:Äther 16:84	n-Propanol:Diäthyläther 16:84
Int. Standard	Thymidin	5-Bromouracil
Injektion	nicht angegeben	10 μ l
Retentionszeit	5-FU 7 min Int.St. 22 min	5-FU 6,4 min Int.St. 12 min
Bodenzahl	5-FU 300 Int.St. 1700	5-FU 2400 Int.St. 4900
Nachweisgrenze	$8 \cdot 10^{-7}$ mol/l	$3 \cdot 10^{-7}$ mol/l

Tabelle 33: 5-FU-Bestimmung nach MACMILLAN [33] und SAMPSON [45] mit Reversed-Phase-Chromatographie.

Abbildung 42: Vergleich von zwei Extraktionsmethoden. Links die Methode nach SAMPSON [45], exemplarisch für Literaturangaben und rechts die Methode dieser Arbeit. Entwicklung siehe Kap.3.3.2.



2. Die Serumaufbereitung besteht aus Deproteinisierung durch Säurefällung und Kochen. Nach Zentrifugation werden 20 μ l des Überstandes injiziert.

Bei den in der Literatur beschriebenen Verfahren wird 5-FU in organisches Lösungsmittel extrahiert (Abb. 42). Dieses Lösungsmittel muß wegen der hohen Polarität von 5-FU ebenfalls möglichst polar sein, darf aber dennoch nicht mit Wasser mischbar sein. Nach Zentrifugation muß die organische Phase unter Stickstoff getrocknet werden. Der Rückstand wird anschließend wieder gelöst und gegebenenfalls neutralisiert. Dann kann die Probe chromatographiert werden.

3. Extraktionsverfahren sind eine mögliche Fehlerquelle. Deshalb verwenden alle Untersucher einen internen Standard, der ebenfalls dem Extraktionsverfahren unterworfen wird (außer bei MACMILLAN). Die richtige Wahl eines Standards kann allerdings sehr schwierig sein. Er soll eine chemisch reine Verbindung sein, die ähnliche chromatographische und Detektor-Eigenschaften hat wie die Probe. Außerdem sollte er in einer Lücke des Chromatogramms eluiert werden. Die für die Standards angegebenen Bodenzahlen zeigen die Schwierigkeit dieser Wahl.

Wir verwenden 5-FU als externen Standard. Durch eine Schlaufeninjektion sind die Dosiervolumina gut reproduzierbar. Wir beobachten beim Messen der gleichen Probe nur Schwankungen der Konzentration im Bereich von 1-3%. Mit den gespeicherten Daten der Eichkurve kann der Integrator unmittelbar nach Ausdruck des Chromatogramms den 5-FU-Peak identifizieren und die Konzentration berechnen.

5.2. Pharmakokinetik von 5-Fluorouracil

Die Idee zu einer regionalen Chemotherapie entwickelte sich in der Auseinandersetzung mit ernststen Nebenwirkungen bei der systemischen Therapie, ohne daß am Ort des Tumors die höchstmögliche Dosis verabreicht werden konnte. Die Erkenntnis, daß eine Erhöhung der Zytostatikakonzentration zu einer höheren Tumortoxizität führt, mündete schließlich in der Entwicklung regionaler Therapie-maßnahmen.

Für die Behandlung von Lebermetastasen beschrieb AIGNER [1] im Jahre 1981 ein operationstechnisches Vorgehen, das die Zytostatika-perfusion der in situ vom systemischen Körperkreislauf isolierten Leber erlaubt.

Mit der isolierten Leberperfusion (ILP) werden in der Leber sehr hohe Zytostatikaspiegel erreicht, ohne das Risiko einer entsprechenden systemischen Toxizität. Ein Vorteil dieser Methode gegenüber der intraarteriellen Infusion (HAI) ist darin zu sehen, daß die Zytostatikakonzentrierung in der Leber nicht vom First-Pass-Effekt abhängt. Bei der HAI gelangt das nach der Leberpassage nicht extrahierte Zytostatikum in den Körperkreislauf, während es bei der ILP über den extrakorporalen Kreislauf erneut der Leber zugeführt wird.

Die von AIGNER gefundenen 5-FU-Spiegel im Perfusat sind sowohl in der Konzentration als auch in der Extraktionsgeschwindigkeit (linearer Abfall) mit unseren Ergebnissen gut vergleichbar [2]. Am Ende der einstündigen Perfusion findet AIGNER noch eine 5-FU-Konzentration im Perfusat von 190-500 $\mu\text{mol/l}$. Bei diesen Konzentrationen kann nach unseren Ergebnissen die Eliminationskapazität der Leber noch überschritten sein. AIGNER beobachtete deshalb keine exponentielle Extraktionsphase (Phase 2).

In den vorliegenden pharmakokinetischen Untersuchungen [4, 15, 29, 33, 41, 49] ist durchwegs eine Extraktionskinetik 1.Ordnung beschrieben. Die Patienten erhielten 5-Fluorouracil entweder intravenös oder oral in einer Dosierung bis zu 15 mg/kg Körpergewicht. Die erreichten Plasmaspiegel lagen höchstens bei 500-800 $\mu\text{mol/l}$. Offensichtlich ist bei dieser Konzentration die Gesamtkörper-Eliminationskapazität noch nicht erreicht. Über ihre Größe lassen sich aus unserer Sicht noch keine Angaben machen, da wir das Verteilungsvolumen nicht genau kennen. Unsere eigenen Ergebnisse bei systemischer Therapie mit 750 mg Fluorouracil deuten darauf hin, daß mit einer Größenordnung von 10-20% des Körpergewichts zu rechnen ist. In der Literatur gehen die Angaben für das Verteilungsvolumen weit auseinander. COHEN [15] gibt 12%, MACMILLAN [33] 25% und SITAR [49] 89% des Körpergewichts an. Möglicherweise spielt auch die analytische Methodik für diese Unterschiede eine Rolle.

Wir führten bisher bei acht Patienten die ILP mit Hyperthermie durch. Die relativ milde Erwärmung führt selbst noch nicht zu einer effektiven Tumortoxizität, die erst ab 42°C zu erwarten ist. Eine Wirkungssteigerung soll vor allem dadurch erreicht werden, daß auf dem Wege einer gesteigerten Durchblutung ein verbesserter Transport des Zytostatikums zum Tumor ermöglicht wird [55]. Im Vergleich zu Perfusionen mit Normothermie konnten wir mit durchschnittlich um 2,0°C erhöhter Temperatur eine Steigerung der Extraktionsgeschwindigkeit von 14% beobachten. In dieser Größenordnung liegt auch die thermokinetische Beschleunigung einer enzymkatalysierten Reaktion. Theoretisch ist bei einer Erhöhung um 10°C eine Verdopplung der Reaktionsgeschwindigkeit zu erwarten [57].

Nach unserer Auffassung ist die 5-FU-Extraktion bei der ILP in Phase 1 von der Konzentration unabhängig, da das Eliminations-

system gesättigt ist. Eine weitere Erhöhung der FU-Konzentration bringt keine gesteigerte Aufnahme in die Leber/Metastasen. Die Aussagekraft des Produktes $\text{Konzentration} \times \text{Zeit}$ als Maß der Effektivität einer Applikationsart ist bei der ILP eingeschränkt. Für 5-FU ist eine Optimierung nur durch eine Verlängerung der Zeit zu erreichen. Ebenso muß man feststellen, daß der onkologische Grundsatz einer möglichst hohen Zytostatikakonzentration bei 5-FU mit einem aktiven Transport- und/oder Metabolisierungsmechanismus dann nicht mehr gilt, wenn dieser Mechanismus gesättigt ist. Um eine direkt toxische Wirkung des Zytostatikums, etwa Gefäßwandläsionen, zu vermeiden und dennoch die maximale Verabreichung sicherzustellen, liegt die optimale Dosierung in Höhe der Sättigungskonzentration. Dies gilt auch für Arteria hepatica-Infusionen, die nur so schnell laufen sollten, daß die Eliminationskapazität der Leber bei arterieller Infusion ausgelastet ist. Folglich ist die systemische Belastung gering, da die Leber den größten Anteil 5-FU extrahieren kann. Unter der Annahme, daß die Eliminationskapazität bei der HAI ähnlich hoch ist wie bei der ILP, ist eine Infusionsgeschwindigkeit von 15-20 mg/min zu empfehlen.

5.3. CEA-Verlauf und Überlebenszeit

GOLD und FREEDMAN fanden 1965 das carcinoembryonale Antigen (CEA) in Adenocarcinomen des Colons und beschrieben es als tumor- und organspezifisch [30]. Später wurde es auch bei extragastrointestinalen Tumoren und entzündlichen gastrointestinalen Erkrankungen gefunden. Leicht erhöhte CEA-Konzentrationen treten auch bei Rauchern auf, selbst bei gesunden Erwachsenen lassen sich manchmal sehr niedrige Spiegel nachweisen.

Bei nichtrauchenden Normalpersonen findet man bei 3% positive

Befunde, das heißt oberhalb des Normgrenzwertes der jeweiligen Methode liegende Konzentrationen. Dagegen haben Raucher in 19% erhöhte CEA-Werte. Allerdings werden bei diesen Personen nur in 0,3% CEA-Spiegel über 10 ng/ml nachgewiesen. Die Positivitätsrate für kolorektale Karzinome beträgt nach einer Sammelstatistik 71% (N = 3285). Mehr als die Hälfte dieser Patienten hat CEA-Spiegel über 10 ng/ml [30] .

Die klinische Bedeutung des CEA liegt vor allem in der Erfolgs- bzw. Verlaufsbeurteilung nach der Operation des Primärtumors. Ein Spiegelabfall in den Normbereich spricht für eine vollständige Tumorentfernung, während Persistenz oder Wiederanstieg den Verdacht auf ein Rezidiv oder eine Metastasierung nahelegt. Ein gewisser Zusammenhang zwischen der Serum-CEA-Spiegelhöhe und der Tumorausbreitung wurde besonders für Dickdarmkarzinome beschrieben [31]. Von verschiedenen Untersuchern wurden hochpathologische Werte (über 10 ng/ml) für das Stadium DUKES A in 0-26%, für Stadium B in 0-35%, C in 13-62% und für Stadium D in 60-80% angegeben.

Alle elf von uns perfundierten Patienten hatten CEA-Spiegel über 10 ng/ml, bei klinisch isolierter Lebermetastasierung und ausgeschlossenen Lokalrezidiv. Häufig war der CEA-Anstieg nach der Primäroperation erster Hinweis auf ein Fortschreiten der Erkrankung.

AIGNER [3] beschreibt für den ersten postoperativen Tag nach der isolierten Leberperfusion einen CEA-Anstieg auf das zwei- bis zehnfache des Ausgangswertes, anschließend einen Abfall auf etwa 50%. Wir beobachteten am Operationstag einen CEA-Abfall auf 13-48% des präoperativen Wertes (12-1134 ng/ml). Von diesen niedrigen Spiegeln (2-361 ng/ml) stieg das CEA in der Regel am ersten postoperativen Tag auf 35-162% an (10-1548 ng/ml) und fiel dann

innerhalb von zwei Wochen auf 9-68% (8-556 ng/ml) des präoperativen Wertes ab. In Übereinstimmung mit AIGNER könnte der deutliche CEA-Anstieg als Anzeichen eines akuten Tumorzellzerfalls interpretiert werden. Nach BRONSTEIN [10] geht mit einer Erniedrigung des CEA auch eine Verkleinerung des Metastasenvolumens einher. Allerdings kann man von der Änderung des Absolutwertes von CEA nicht direkt auf die Größenordnung der Volumenänderung oder der zerstörten Tumormasse schließen.

Alle unsere Patienten haben auf die ILP angesprochen, wenn man als einziges Remissionskriterium einen CEA-Abfall um 50% und mehr ansieht. Fünf von neun im Langzeitverlauf beobachteten Patienten erreichten jedoch nach einem Intervall von 2,5 bis 6 Monaten wieder den präoperativen Ausgangswert. Von diesen fünf Patienten sind vier nach einer mittleren Überlebenszeit von 11 Monaten verstorben. Verlangt man dagegen einen CEA-Abfall bis auf Werte unter 10 ng/ml, kann man dies nur bei drei von neun Patienten beobachten. Leider ist der postoperative Kurzzeitverlauf nur von einem der drei Patienten bekannt. Der CEA-Anstieg unmittelbar nach der ILP war allerdings bei diesem Patienten W.R.(5) am ausgeprägtesten. Es ist aber noch nicht klar, ob aus der Höhe des CEA-Gipfels der frühen postoperativen Phase auf den Grad des zu erwartenden Ansprechens beziehungsweise auf den weiteren Krankheitsverlauf geschlossen werden darf.

Für eine bessere Beurteilung einer Remission sollte jedoch zumindest auch die computertomographische Veränderung der Lebermetastasen herangezogen werden. Ein Vergleich der Therapieergebnisse verschiedener Untersucher ist ausgesprochen schwierig. Zum einen muß die Stadieneinteilung von Lebermetastasen diagnostisch möglich und reproduzierbar sein, zum anderen sollte eine einheitliche Definition von Ansprechen und Nichtansprechen von allen Untersuchern anerkannt werden. Eine weitere Unterteilung in Gruppen mit

unterschiedlichem therapeutischem Vorgehen verringert die jeweilige Patientenzahl zusätzlich, sodaß statistisch gesehen eigentlich keine prozentualen Angaben mehr erlaubt sind.

In Tabelle 34 sind die Ansprechraten und medianen Überlebenszeiten bei systemischer und regionaler Chemotherapie angegeben. Es sind nur die Patienten aufgeführt, die isolierte Lebermetastasen eines kolorektalen Karzinoms hatten und eine vergleichbare Therapie erhielten. Selbst bei den strengen Remissionskriterien nach AIGNER [3] ist bei der ILP mit einer hohen Ansprechrate zu rechnen. Ob die ILP als initiale und aggressivste chemotherapeutische Maßnahme deutliche Vorteile bezüglich der medianen Überlebenszeit bringt, ist noch nicht sicher bewiesen. AIGNER führt die ILP seit nunmehr 48 Monaten durch und hat eine aktuelle Überlebenszeit von 21,5 Monaten. Wir begannen vor 22 Monaten mit der ILP und erreichten bisher eine mittlere und mediane Überlebenszeit von 11,5 Monaten. Allerdings ist zu berücksichtigen, daß bei den Patienten von AIGNER und beim eigenen Krankengut, nach der ILP die regionale Chemotherapie über einen implantierten Arteria hepatica-Katheter mit 5-Fluorouracil und Mitomycin C fortgesetzt wurde.

Das Problem der toxischen Nebenwirkungen bei systemischer 5-Fluorouracil-Therapie ist hinreichend bekannt. Außerdem sind bei dieser Therapieform die Zytostatikaspiegel am Ort des Tumors wesentlich geringer als bei den regionalen Verfahren.

Aufgrund einer Extraktionsrate von 69-92% [16] wird bei einer kontinuierlichen Arteria hepatica-Infusion mit fluorierten Pyrimidinen in der Regel FUDR gegeben. Nachteilig ist die relativ hohe Komplikationsrate. M. KEMENY [26] beobachtet bei 58,7% der Patienten eine chemische Hepatitis und bei 17,4% eine irreversible Gallengangsstenosierung. Auch SCHAFF und LANGE [47] beobachten diese wichtigen Komplikationen: 19,3% chemische Hepatitis, 13%

Untersucher	Patienten	Therapie	Ansprechkriterium		Remission	mediane ÜLZ	
			CEA ↓	Tumor ↓		Mon.	Mon.
KEMENY N. ¹⁾ [27]	47	i. v. 15mg/kg KG	-	>30-50%	3	8/47	17%
BALCH [5]	81	HAI/FUDR	>33%	-	-	-	88%
COHEN [13]	15	HAI/FUDR	-	>50%	>3	3/15	20%
NIEDERHUBER [37]	50	HAI/FUDR	>50%	>50%	-	42/50	83%
KEMENY M. [26]	24	HAI/FUDR	-	>50%	>3	16/24	66%
SCHAFF [47]	31	HAI/FUDR	-	>15%	-	20/31	65%
AIGNER ²⁾ [3]	5	ILP+HAI	>50%	>50%	>3	5/5	100%
AIGNER ³⁾ [3]	41	ILP+HAI	>50%	>50%	>3	34/41	83%
EIG. PAT. 4)	11	ILP+HAI	>50%	+	-	11/11	100%
5)			<10ng/ml	-	>3	3/9	33%

1) Übersichtsarbeit aus dem Jahr 1983

2) ILP: 5-FU + Mitomycin C und HAI: 5-FU + Mitomycin C

3) Alle von AIGNER durchgeführten ILP bei Lebermetastasen kolorektaler Karzinome mit verschiedener Kombination und Dosierung der Zytostatika.

4) Schema wie unter 2)

5) Unsere Patienten nach anderen Remissionskriterien beurteilt. Bei zwei Patienten ist der Beobachtungszeitraum nach der ILP zu kurz.

Tabelle 34: Systemische und regionale Chemotherapie bei Lebermetastasen.

Gallengangsstenosen und 9,6% Magenulkus. Weitere Probleme, die häufig auch bei arteriellen Ports auftreten, betreffen die Thrombosierung, sowohl des Katheters als auch der Arteria hepatica. Vor jedem Infusionszyklus sollte man deshalb das System auf Durchgängigkeit und korrekte Funktion mit radiologischen Verfahren testen. FINKE und Mitarb. [17] fanden bei 59 Portkontrollen in 47% keine ausreichende Funktion des Systems.

Zweifellos ist die isolierte Leberperfusion ein Therapiemodus mit einer großen Patientenbelastung. Nur bei strenger Indikation und entsprechendem Allgemeinzustand des Patienten sollte sie von einem erfahrenen Team durchgeführt werden. Kein anderes Verfahren ermöglicht eine gleichermaßen strenge Lokalisation der zytostatischen Wirkung im Zielorgan. Der personelle und technische Aufwand ist unseres Erachtens gerechtfertigt, nicht zuletzt im Hinblick auf einen therapeutischen Fortschritt durch neue Kenntnisse über bekannte Zytostatika. Nach AIGNER ist die isolierte Leberperfusion nur so gut wie die dabei verwendeten Zytostatika und deren Dosierung.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Die isolierte Leberperfusion (ILP) wurde bei 11 Patienten (4 Frauen und 7 Männer, 41-56 Jahre alt, Median 51 Jahre) mit einer auf die Leber beschränkten Fernmetastasierung eines kolorektalen Primärtumors durchgeführt. Das operationstechnische Vorgehen bei der ILP ermöglicht eine hohe Zytostatikakonzentration in der vom Körperkreislauf isolierten Leber, ohne systemische Nebenwirkungen zu verursachen.

Bei allen Patienten wurden insgesamt 750 mg 5-Fluorouracil und 15 mg Mitomycin C als Bolus in den Perfusionskreislauf injiziert. Mit dieser Menge wurden 5-FU-Perfusatkonzentrationen von $1,3 \cdot 10^{-3}$ - $2,7 \cdot 10^{-3}$ mol/l erreicht. Die Perfusionsdauer betrug 72 ± 15 Minuten. Acht Patienten wurden unter Hyperthermie-Bedingungen (Lebertemperatur $39,5 \pm 0,9^\circ\text{C}$, Wärmeenergiezufuhr 438 ± 223 J/min 100g Lebergewebe) und drei Perfusionen unter Normothermie-Bedingungen (Lebertemperatur $37,5 \pm 0,2^\circ\text{C}$, Wärmeenergiezufuhr 235 ± 29 J/min 100g Lebergewebe) durchgeführt.

5-Fluorouracil im Serum wurde mit der Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC) nachgewiesen. Die Serumproben wurden zunächst durch Säurefällung und Kochen deproteinisiert. Für die Trennung des Probengemisches verwendeten wir eine Reversed-Phase-Säule (Shandon ODS Hypersil $5\mu\text{m}$, 250mm I.D. 4,5mm) und als Eluenten einen 0,01M Kaliumdihydrogenphosphatpuffer mit pH 3,9. Die Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 266nm. Bei einem Fluß von 1,2 ml/min war die Retentionszeit von 5-Fluorouracil 4,9 Minuten. Die untere Nachweisgrenze lag bei $7 \cdot 10^{-7}$ mol/l.

Die Pharmakokinetik von 5-Fluorouracil bei der isolierten Leberperfusion zeigt zwei unterschiedliche Phasen. In der ersten Phase wird 5-FU mit einer konstanten Extraktionsrate von $11,2 \pm 1,9$ mg/min

aus dem Perfusat entfernt (Kinetik nullter Ordnung). Die 5-FU-Konzentration hat in dieser Phase keinen Einfluß auf die Extraktionsgeschwindigkeit. In der zweiten Phase erfolgt die FU-Abnahme in Abhängigkeit von der Konzentration mit Extraktionskonstanten von 0,16–0,52 $\mu\text{mol/l min}$ (Kinetik 1. Ordnung). Die Halbwertszeiten betragen 1,3–4,3 Minuten. Nach diesen Ergebnissen gibt es für 5-FU in der Leber ein aktives Eliminationssystem (Transport oder Metabolisierung), das ab einer bestimmten 5-FU-Konzentration gesättigt ist. Eine weitere Steigerung der 5-FU-Konzentration bringt deshalb keine zusätzliche Erhöhung der Extraktion. Bei Hyperthermie-Perfusionen liegen die mittleren Extraktionsraten in der ersten Phase um 14% höher als bei Normothermieperfusionen. In dieser Größenordnung liegt die thermokinetische Beschleunigung einer enzymkatalysierten Reaktion.

Nach einem CEA-Abfall am Operationstag auf 13–48% (2–361 ng/ml) des präoperativen Wertes (12–1134 ng/ml), beobachteten wir am ersten postoperativen Tag einen Anstieg auf 35–162% (10–1548 ng/ml) des Ausgangswertes (mediane Verdopplungszeit 0,5 Tage). Danach fiel das CEA bis zum 14. postoperativen Tag zunächst schnell (med. Halbwertszeit 2,1 Tage) und dann langsamer (med. Halbwertszeit 13,6 Tage) auf 9–68% (8–556 ng/ml) des präoperativen Wertes ab. Möglicherweise sprechen diese Änderungen des CEA-Spiegels für einen akuten Tumorzellzerfall. Bei 5 von 9 Patienten erreichte das CEA 2,5 bis 6 Monate nach der ILP wieder die gleiche Konzentration wie vor der Perfusion. Vier dieser fünf Patienten mit den höchsten CEA-Konzentrationen (759–8065 ng/ml) sind nach einer mittleren Überlebenszeit von 11,6 Monaten nach der ILP verstorben. Die Überlebenszeit aller Patienten nach der isolierten Leberperfusion liegt derzeit bei 1,5–21,5 Monaten, die mediane und die mittlere Überlebenszeit bei 11,5 Monaten.

7. LITERATUR

- 1 Aigner K, Walther H, Tonn JC, Krahel M, Wenzl A, Merker G, Schwemmler K : Die isolierte Leberperfusion mit 5-Fluorouracil beim Menschen. Chirurg 1982;53:571-573
- 2 Aigner K, Walther H, Tonn JC, Link KH, Schoch P, Schwemmler K : Die isolierte Leberperfusion bei fortgeschrittenen Metastasen kolorektaler Karzinome. Onkologie 1984;7: 13-21
- 3 Aigner K (Hrsg): Regionale Chemotherapie der Leber: Isolierte Perfusion, intraarterielle Infusion und Resektion. Karger, 1985 Beiträge zur Onkologie; Bd 21
- 4 Aubert C, Luccioni PC, Sommadossi JP, Cano JP : Comparative determinations of 5-fluorouracil in plasma using GC/MS and HPLC. Arznei-Forsch/Drug Res 1981;31(II): 2048-2053
- 5 Balch CM, Urist MM, Soong SJ, McGregor M : A prospective phase II clinical trial of continuous FUDR regional chemotherapy for colorectal metastases to the liver using a totally implantable drug infusion pump. Ann Surg 1983;198: 567-573
- 6 Becker N, Frentzel-Beyme R, Wagner G : Krebsatlas der Bundesrepublik Deutschland. 2.Auflage. Springer, Berlin Heidelberg New York Tokyo 1984

- 7 Bengmark S, Hafström L : The natural history of primary and secondary malignant tumors of the liver.I.The prognosis for patients with hepatic metastases from colonic and rectal carcinoma by laparotomy. Cancer (Philad) 1969;23:198-202
- 8 Bengmark S, Hafström L, Jeppson B, Jönsson PE, Ryden S, Sundqvist K : Metastatic disease in the liver from colorectal cancer:An appraisal of liver surgery. World J Surg 1982;6:61-65
- 9 Blum U, Ungeheuer E, Cappel J, Probst M : Das kolorektale Karzinom:Diagnostik, Therapie und Nachsorge. Dt Ärztebl 1984;81:1282-1288
- 10 Bronstein BR, Steele GD, Ensminger W, Kaplan WD, Lowenstein MS, Wilson RE, Forman J, Zamcheck N : The use and limitations of serial plasma carcinoembryonic antigen (CEA) levels as a monitor of changing metastatic liver tumor volume in patients receiving chemotherapy. Cancer 1980;46:266-272
- 11 Cady B : Natural history of primary and secondary tumors of the liver. Semin Oncol 1983;10:127-134
- 11a Chabner BA, Myers CE : Clinical Pharmacology of Cancer Chemotherapy. In: DeVita VT Jr., Hellman S, Rosenberg SA (ed): Cancer:Principles & Practise of Oncology. 2.Edition. J.P.Lippincott Company Philadelphia 1985, pp287-328
- 12 Clarksen B, O'Connor A, Winston L, Hutchinson D : The physiologic disposition of 5-fluorouracil and 5-fluoro-2'deoxyuridine in man. Clin Pharmacol Ther 1964;5:581-610

- 13 Cohen AM, Kaufman SD, Wood WC, Greenfield AJ : Regional hepatic chemotherapy using an implantable drug infusion pump. Am J Surg 1983;145:529-533
- 14 Cohen JL, Brown RE : High-performance liquid chromatographic analysis of 5-fluorouracil in plasma. J Chromatogr 1978;151:237-240
- 15 Cohen JL, Irwin LE, Marshall AJ, Darvey H, Bateman JR : Clinical pharmacology of oral and intravenous 5-fluorouracil. Cancer Chemother Rep 1974;58:723-731
- 16 Ensminger WD, Rosowsky A, Raso V, Levin DC, Glode M, Come S, Steele G, Frei E : A clinical-pharmacological evaluation of hepatic arterial infusions of 5-fluoro-2'-deoxyuridine and 5-fluorouracil. Cancer Res 1978;38:3784-3792
- 17 Finke C, Piroth HD, Heuser Y, Ziayee N : Notwendigkeit und Methodik systemischer radiologischer Funktionskontrollen bei arteriellen Ports oder Kathetern. II. International Conference on Advances in Regional Cancer Therapy. Giessen, West-Germany. August 26-28, 1985
- 18 Fischer J, Weigand H, Preiß J : Regionale Chemotherapie von Lebermetastasen. In: Fischer J (Hrsg): Taschenbuch der Onkologie. Urban und Schwarzenberg, München Wien Baltimore 1983, S.118-126
- 19 Flanagan L, Foster JH : Hepatic resection for metastatic cancer. Amer J Surg 1964;108:551

- 20 Forth W, Henschler D, Rummel W (Hrsg): Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 3.Aufl. Bibliographisches Institut, Mannheim Wien Zürich 1980
- 21 Foster JH : Survival after liver resection for secondary tumors. Am J Surg 1978;135:389-394
- 22 Freeman DH : Liquid chromatography in 1982. Science 1982;218:235-246
- 23 Heberer G, Denecke H, Pratschke E, Teichmann R : Anterior and low anterior resection. World J Surg 1982;6:517
- 24 Hsu LSF, Mars TC : Determination of 5-fluorouracil in human plasma by high-pressure ion-exchange chromatography. Ann Clin Biochem 1980;11:272-276
- 25 Huberman MS : Comparison of systemic chemotherapy with hepatic arterial infusion in metastatic colorectal carcinoma. Semin Oncol 1983;10:238-248
- 26 Kemeny MM, Goldberg DA, Browning S, Metter GE, Miner PJ, Terz JJ : Experience with continuous regional chemotherapy and hepatic resection as treatment of hepatic metastases from colorectal primaries. A prospective randomized study. Cancer 1985;55:1265-1270
- 27 Kemeny N : The systemic chemotherapy of hepatic metastases. Semin Oncol 1983;10:148-158
- 28 Kinsella TJ : The role of radiation therapy alone and combined with infusion chemotherapy for treating liver metastases. Semin Oncol 1983;10:215-222

- 29 Kok RM, Jong APJM de, Groeningen CJ van, Peters GJ, Lankelma J : Highly sensitive determination of 5-fluorouracil in human plasma by capillary gas chromatography and negative ion chemical ionization mass spectrometry. J Chromatogr 1985;343:59-66
- 30 Lamerz R, Fateh-Moghadam A : Carcinofetale Antigene. II.Carcinoembryonales Antigen (CEA). Klin Wschr 1975;53: 193-203
- 31 Lamerz R, Ruider H : Bestimmungen von karzinoembryonalem Antigen bei Patienten mit Dickdarmtumoren. Erfahrungen mit einem eigenen Radioimmunoassay. Münch med Wschr 1976; 118:371-376
- 32 Leenheer AP de, Nelis HJCF : Development and evaluation of selected assays for drugs and drug metabolites in biological materials. Analyst 1981;106:1025-1035
- 33 MacMillan WE, Wolberg WH, Welling PG : Pharmacokinetics of fluorouracil in humans. Cancer Res 1978;38:3479-3482
- 34 Meyer V : Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie. 3.Aufl. Diesterweg, Salle, Sauerländer 1984
- 35 Morris MJ, Newland RC, Pheils MT et al. : Hepatic metastases from colorectal carcinoma:An analysis of survival rates and histopathology. Aust NZ J Surg 1977;47: 365-368
- 36 Niederhuber JE, Ensminger WD : Surgical considerations in the management of hepatic neoplasia. Semin Oncol 1983;10: 135-147

- 37 Niederhuber JE, Ensminger WD, Gyves J, Thrall j, Walker S, Cozzi E : Regional chemotherapy of colorectal cancer metastatic to the liver. *Cancer* 1984;53:1336-1343
- 38 Nielsen J, Balslev J ,Jensen HE : Carcinoma of the colon with liver metastases. *Acta Chir Scand* 1971;137:463-465
- 39 Oxley EM, Ellis H : Prognosis of carcinoma of the large bowel in the presence of liver metastases. *Br J Surg* 1969;56:149-152
- 40 Pestana C, Reitemeier RJ, Moertel CG, Judd ES, Dockerty MB: The natural history of carcinoma of the colon and rectum. *Am J Surg* 1964;108:826-829
- 41 Phillips TA, Howell A, Grieve RJ, Welling PG : Pharmacokinetics of oral and intravenous fluorouracil in humans. *J Pharm Sci* 1980;69:1428
- 42 Ramming KP : The effectiveness of hepatic artery infusion in treatment of primary hepatobiliary tumors. *Semin Oncol* 1983;10:199-205
- 43 Rawson RA : The binding of T-1824 and structurally related diazo dyes by the plasma proteins. *Am J Physiol* 1943;138:708-717
- 44 Rudy BC, Senkowsky BZ : Fluorouracil. In:Florey F (ed) : *Analytical Profiles of Drug Substances vol.2* Academic Press, New York 1973, pp221-244

- 45 Sampson DC, Fox RM, Tattersall MHN, Hensley WJ : A rapid high-performance liquid chromatographic method for quantitation of 5-fluorouracil in plasma after continuous intravenous infusion. Clin Biochem 1982;19:125-128
- 46 Sauer H, Wilmanns W : Internistische Therapie maligner Erkrankungen. 2.Aufl. Urban und Schwarzenberg, München Wien Baltimore 1985, S.80-84
- 47 Schaff J, Lange J, Ketterl R, Zänker KS, Siewert JR : Continuous intraarterial FUDR infusion by an implantable pump in isolated liver metastases. II. International Conference on Advances in Regional Cancer Therapy. Giessen, West-Germany. August 26-28, 1985
- 48 Schalhorn A, Denecke H, Peyerl G, Kühl M, Wilmanns W : Pharmakologische und pharmakokinetische Gesichtspunkte der regionalen Chemotherapie mit fluorierten Pyrimidinen. In: Kleinsorge (Hrsg): Apparative Technik und Pharmakotherapie. Fischer 1985 (im Druck)
- 49 Sitar DS, Shaw DH, Thirwell MP, Ruedy JR : Disposition of 5-fluorouracil after intravenous bolus doses of a commercial formulation to cancer patients. Cancer Res 1977;37:3981-3984
- 50 Statistisches Bundesamt Wiesbaden (Hrsg): Gesundheitswesen Fachserie 12, Reihe 4. Todesursachen 1983. Kohlhammer, Stuttgart Mainz
- 51 Storm KF, Harrison WH, Elliott RS, Morton DL : Normal tissue and solid tumor effects of hyperthermia in animal models and clinical trials. Cancer Res 1979;39:2245-2251

- 52 Storm KF, Morton DL : Hyperthermia:Adjunctive modality for hepatic infusion chemotherapy. Semin Oncol 1983;10:223-227
- 53 Sugarbaker PH, MacDonald J, Gunderson LL : Colorectal Cancer. In: DeVita VT Jr., Hellman S, Rosenberg SA (ed): Cancer:Principles & Practise of Oncology. 1.Edition. J.P.Lippincott Company Philadelphia 1982, pp643-723
- 54 Valeriotte F, Santelli G : 5-Fluorouracil. Pharmac Ther 1984;24:107-132
- 55 Vaupel RW, Otte J, Manz R : Oxygenation of malignant tumors after localized microwave hyperthermia. Radiat Environ Biophys 1982;20:289
- 56 Waldeyer A, Meyer A : Anatomie des Menschen. Bd.I. 13.Aufl. De Gruyter, Berlin New York 1976, S.219
- 57 Weiß L : Biokatalyse. In: Löffler G, Petrides PE, Weiß L, Harper HA : Physiologische Chemie. 2.Aufl. Springer, Berlin Heidelberg New York 1979
- 58 Wood CB, Gillis CR, Blumgart LH : A retrospective study of natural history of patients with liver metastases from colorectal cancer. Clin Oncol 1976;2:285-288

NACHWORT

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden in der Chirurgischen Klinik und der Medizinischen Klinik III des Klinikums Großhadern der Universität München durchgeführt. Für die großzügige Bereitstellung der notwendigen Mittel bin ich Herrn Prof. Dr. med. G. Heberer und Herrn Prof. Dr. med. W. Wilmanns sehr dankbar. Besonders dankbar bin ich Herrn Prof. Dr. med. H. Denecke für die Überlassung des Themas und die tatkräftige Betreuung der Arbeit. Seine wertvolle Kritik und die stets freundlich gewährte Unterstützung waren für mich eine große Hilfe. Ganz herzlich möchte ich auch Herrn Priv.Do. Dr. med. A. Schalhorn danken. In seinem Labor konnte ich während vieler Monate Erfahrungen mit der HPLC sammeln. In der Diskussion der methodischen Probleme und der Ergebnisse mit Herrn Dr. Schalhorn habe ich nicht nur in wissenschaftlicher Hinsicht sehr viel gelernt. Weiterhin bin ich Herrn Prof. Dr. med. R. Lamerz (Medizinische Klinik II) und seinen Mitarbeiterinnen für die vielen CEA-Bestimmungen zu besonderem Dank verpflichtet. Ebenso dankbar bin ich Herrn Prof. Dr. med. U. Finsterer (Institut für Anästhesiologie) und seinen Assistentinnen für die Durchführung der Evans-Blue-Messungen. Sehr zu Dank verpflichtet für die verständnisvolle Zusammenarbeit und für die Hilfe bei der Daten- und Proben-gewinnung bin ich Herrn Dr. med. N. Demmel und Frau Dr. med. M. Pauli. Nicht zuletzt möchte ich Frau G. Stupp-Poutot und Frau K. Heil für ihre Ratschläge und ihre Hilfe bei der Durchführung der Laboranalysen recht herzlich danken.

Diese Arbeit wurde teilweise auch durch Mittel der Deutschen Forschungsgemeinschaft und des Curt-Bohnewand-Fonds gefördert.

Lebenslauf

Am 21. Juli 1954 wurde ich als zweites von drei Kindern des Kaufmanns Oskar Peyerl und seiner Ehefrau Wiltrud Peyerl, geb. Kirner in München geboren.

Von 1960 bis 1964 besuchte ich die Volksschule an der Ostpreußenstraße in München. Am Luitpold-Gymnasium erwarb ich 1974 das Zeugnis der Reife. Nach dem Abitur war ich an der Ludwig Maximilians-Universität in München zunächst im Fachbereich Physik immatrikuliert. 1979 begann ich das Studium der Humanmedizin. Im November 1984 absolvierte ich nach zwölf Fachsemestern die 3. Ärztliche Prüfung.

1985 arbeitete ich im Rahmen der Dissertation im Forschungslabor A am Klinikum Großhadern. Seit Januar 1986 bin ich wissenschaftliche Hilfskraft an der Chirurgischen Klinik im Klinikum Großhadern der Universität München.

Ich bin verheiratet und habe ein Kind.

